

Zoologie

**Fragmente von *Drosophila*-Myosin:
Expression, Aggregationseigenschaften und deren Bedeutung für
Modelle zur Filamentstruktur**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Gereon Ader

aus Münster

- 2003 -

Dekan:	Prof. Dr. Alexander Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Gernot Beinbrech
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Walter Stöcker

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2003

Tag der Promotion: 21.07.2003

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

- Ader G., Pepe F.A. and Beinbrech G. (1996): Aggregationseigenschaften von Fragmenten des Myosin-Stabes von *Drosophila*. *Verh. Dtsch. Zool. Ges. Oldenburg* **89**, 323
- Ader G., Pepe F.A. and Beinbrech G. (1997): Functional domains of *Drosophila* LMM affecting self assembly and paramyosin binding. *J. Muscle Res. Cell Motility* **18**, 246-247
- Ader G., Ziegler C., Pepe F.A. and Beinbrech G. (1998): Expression and aggregation patterns of *Drosophila* light meromyosin fragments. *Abstr. Intern. Symp. „Biological motility: modern methods for studying“, Pushchino, Russia*, pp 3-5
- Ziegler C., Ader G. and Beinbrech G. (1994): Insect paramyosin and projectin: simple and rapid purification and their binding to myosin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **15**, 200-201
- Ziegler C., Ader G., Rösgen J. and Beinbrech G. (1998): ATP and exon-19 C-termini change the stagger of *Drosophila* LMM-fragments from 38 to 43 nm. *Abstr. Intern. Symp. „Biological motility: modern methods for studying“, Pushchino, Russia*, pp 183-185
- Ziegler C., Ader G., Rösgen J. and Beinbrech G. (1998): Aggregation properties of the C-terminal third of light meromyosin and its relationship to the cross-bridge arrangement in insect flight muscle. *Zoology Jena* **101** Suppl. I, 71
- Ziegler C., Ader G., Rösgen J. and Beinbrech G. (1999): ATP and Exon-19 C-termini change the periodicity of paracrystals of *Drosophila* LMM-fragments from 38 nm to 43 nm. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **20**, 817

Weitere Publikationen:

- Ader G., Wrona E., Ziegler C. und Beinbrech G. (1991): Charakterisierung von Myosin aus Insekten-Flugmuskeln. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, **85**, 494
- Chowrashi, P. K., Pemrick, S. M., Li, S., Yi, P., Clarke, T., Maguire, B., Ader, G., Saintigny, P., Mittal, B., Tewari, M., Stoeckert, C., Stedman, H. H., Sylvester, J. E. & Pepe, F. A. (1996). The myosin filament XV assembly: contributions of 195 residue segments of the myosin rod and the eight C-terminal residues. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **17**, 555-573
- Goebeler, M., Roth, J., van den Bos, C., Ader, G. & Sorg, C. (1995). Increase of calcium levels in epithelial cells induces translocation of calcium-binding proteins migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8) and MRP14 to keratin intermediate filaments. *Biochem. J.* **309** (Pt 2), 419-424
- Ziegler C., Ader G. and Beinbrech G. (1993): Evidence for two myosin types in indirect insect flight muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* **107B**, 91-98
- Ziegler C., Ader G. and Beinbrech G. (1993): Electrophoretic study on heavy and light chains of myosin from synchronous and asynchronous flight muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **14**, 273

Meiner Tochter Ann-Christin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Geräte.....	18
2.1.2	Chemikalien	20
2.1.3	Molekularbiologisches Material	20
2.1.4	Sonstige Materialien	21
2.1.5	Versuchstiere	21
2.2	Klonierung.....	22
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.2.2	PCR	23
2.2.3	Restriktionsverdau	25
2.2.4	Plasmidpräparation	25
2.2.4.1	Vorbereitung des pET-Vektors	26
2.2.5	Ligation	27
2.2.6	Transformation.....	27
2.2.7	„Screening“	28
2.2.8	Expressionssysteme	28
2.3	Mutagenese	30
2.3.1	Mutation von seltenen Arginin-Codons.....	30
2.3.1.1	Umklonierung.....	31
2.3.1.2	Gewinnung Uracil-haltiger DNA	32
2.3.1.3	Präparation von ssDNA (nach Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	32
2.3.1.4	<i>in vitro</i> -Synthese des Komplementärstranges	33
2.3.1.5	<i>Screening</i>	35
2.3.1.6	Sequenzieren.....	35
2.3.2	Serin-Glutamat-Austausch im durch Exon 19 kodierten Abschnitt.....	35
2.4	Sequenzierung.....	36
2.4.1	Thermocycler-Reaktion	37
2.4.2	Sequenzier-Gele	38
2.5	Expression	39
2.5.1	Anzucht.....	40
2.5.2	Zellaufschluss	40
2.5.3	Affinitätschromatographie	41
2.6	Dünnschnitte von induzierten Bakterien	42

2.6.1	Einbettung.....	43
2.6.2	Schneiden.....	44
2.6.3	Kontrastierung.....	44
2.7	Rotationsbedampfung.....	44
2.7.1	Probenvorbereitung.....	45
2.7.2	Bedampfung.....	45
2.8	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie.....	46
2.8.1	Konzentrationsbestimmung.....	46
2.8.2	Durchführung.....	47
2.9	Aggregationsversuche.....	48
2.9.1	Zwei-Schritt-Gradienten-Dialyse.....	48
2.9.2	Mehrschritt-Dialyse.....	49
2.9.3	SDP (Standard-Dilution-Procedure) nach Pepe <i>et al.</i> (1986).....	49
2.9.4	Paramyosin-Koaggregation.....	49
2.10	Löslichkeitsuntersuchungen.....	50
2.11	Reinigung von Paramyosin und Projectin.....	50
2.11.1	Myofibrillen-Reinigung.....	51
2.11.2	Extraktion.....	51
2.11.3	Anionenaustausch-Chromatographie.....	52
2.12	Quantitativer Bindungstest.....	53
2.12.1	Biotinylierung.....	54
2.12.2	Plattentest.....	55
2.13	<i>in situ</i> -Phosphorylierung von Muskelzell-Proteinen.....	56
2.13.1	Markierungsansatz.....	56
2.13.2	Isoelektrische Fokussierung.....	57
2.13.3	SDS-PAGE und Blot.....	58
2.14	<i>in vitro</i> -Phosphorylierung von LMM-Fragmenten.....	59
2.14.1	Thorax-Präparation.....	59
2.14.2	Cuticula-Präparation.....	59
2.14.3	Phosphorylierungs-Ansatz.....	60
2.14.4	Aggregation <i>in vitro</i> phosphorylierter Fragmente.....	61
2.15	Negativ-Kontrastierung.....	61
2.16	Elektronenmikroskopie.....	62
2.17	Kristallisationsversuche auf Lipid-Oberflächen.....	62
2.17.1	Herstellung „löchriger“ Kohlefilme nach Fukami <i>et al.</i> (1965).....	63
2.17.2	Probenvorbereitung.....	64

2.17.3	Kristallisationsansatz	64
2.17.4	Probennahme	64
2.17.5	Elektronenmikroskopie.....	65
2.18	Beugungsexperimente.....	65
2.19	Quantitative Proteinbestimmung.....	65
2.20	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
2.20.1	Probenvorbereitung	66
2.20.2	Gellauf	67
3	Ergebnisse	69
3.1	Klonierung.....	69
3.2	Expression.....	75
3.3	Charakterisierung der LMM-Fragmente	77
3.3.1	SDS-PAGE	77
3.3.2	Rotationsbedampfung.....	80
3.3.3	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie.....	81
3.3.4	Löslichkeit.....	84
3.4	Cytosolische Strukturen in Bakterien.....	86
3.5	Phosphorylierung von <i>Drosophila</i> -Myosin	88
3.5.1	Markierung von Proteinen des Thorax <i>in situ</i>	88
3.5.2	<i>in vitro</i> -Phosphorylierung von Fragmenten.....	91
3.5.3	Aggregate von phosphorylierten Fragmenten	93
3.6	Wechselwirkung mit Myosin-assoziierten Proteinen.....	96
3.6.1	Präparation von Paramyosin und Projektin	96
3.6.2	Bindungs-ELISA.....	98
3.6.3	Paramyosin-Koaggregation.....	100
3.7	Fragment-Aggregate.....	105
3.7.1	Aggregate mit einer 43,5 nm-Periodizität	105
3.7.2	Aggregate mit einer Grundperiode von 14,5 nm.....	107
3.7.3	Aggregate mit 58 nm-Charakteristiken	113
3.7.4	Aggregate mit einer übergeordneten Periode von 116 nm	119
4	Diskussion.....	123
4.1	Klonierung und Expression	124
4.1.1	Fragment-Aggregate in <i>E.coli</i> -Zellen.....	131
4.2	Physiko-chemische Eigenschaften der Fragmente.....	134
4.2.1	Molekulargewicht	134
4.2.2	Moleküllänge.....	135

4.2.3	α -Helix-Gehalt	137
4.2.4	Löslichkeit	139
4.3	Fragment-Aggregate	142
4.3.1	Das 43,5 nm-Muster.....	143
4.3.2	14,5 nm-Muster	147
4.3.3	58 nm-Modulation	153
4.3.4	116 nm-Periode	157
4.3.5	Helikale Beugung.....	161
4.4	Modell zur Molekulanordnung mit einer Periode von 116 nm	166
4.4.1	Subfilamente	166
4.4.2	Molekülpositionen im Subfilament	169
4.4.3	Kombination von Subfilamenten.....	172
4.4.4	Einordnung und Implikationen des Modells	177
4.4.4.1	Sarkomer-übergreifende Aspekte.....	177
4.4.4.2	Köpfchen in der 14,5 nm-Ebene.....	180
4.4.4.3	Köpfchenmuster	184
4.4.4.4	<i>Backbone</i> -Struktur	186
4.5	Struktur und Funktion: Domänen des <i>Drosophila</i> -LMM	190
4.5.1	C-terminale zwei Drittel des Insekten-LMM	190
4.5.1.1	Insektenspezifische Zusammenlagerung	190
4.5.1.2	Struktur	191
4.5.1.3	Phosphorylierung	194
4.5.1.4	Molekülabstände.....	198
4.5.2	N-terminales Drittel des Insekten-LMM	199
4.5.2.1	Einfluss auf Aggregate	199
4.5.2.2	Paramyosin-Bindung.....	200
4.5.3	C-terminale Sequenzen	203
5	Zusammenfassung	205
6	Abkürzungsverzeichnis	208
7	Literaturverzeichnis	211

1 Einleitung

Innerhalb der Stoffklasse der Proteine nimmt das Myosin des quergestreiften Muskels in gewisser Weise eine Sonderstellung ein. Durch eine Zweiteilung des Moleküls in eine globuläre, katalytisch aktive "Kopf"domäne und einen stabförmigen "Schwanz"teil (Lowey *et al.*, 1967) sind so unterschiedliche Funktionen wie die Umsetzung von chemischer in mechanische Energie und die Fähigkeit zum Aufbau hochgeordneter Strukturen in einer molekularen Einheit zusammengefasst. Eine Aufteilung in funktionell unterschiedliche Abschnitte ist zwar keineswegs ein einzigartiges Phänomen, in der Tat gehen viele enzymatische Prozesse mit der Bindung des Moleküls an beispielsweise andere Proteinkomponenten oder die Zellmembran einher. Im Falle des Myosins ist darüber hinaus aber die Abstimmung dieser Funktionen in bemerkenswerter Weise mit der Ausbildung polymerer Strukturen im 3-dimensionalen System des myofibrillären Apparates verbunden.

Die Fähigkeit, unter Verbrauch chemisch gespeicherter Energie gerichtete Bewegungen auszuführen, hat das Myosin mit Proteinen wie Kinesin, das für intrazelluläre Transportvorgänge verantwortlich ist, und Dynein, das die Cilien-Bewegung treibt, gemeinsam. Deren ATP-spaltende Köpfe werden inzwischen unter dem Oberbegriff der "molekularen Motoren" zusammengefasst, deren Funktionsausübung in allen Fällen an das Vorhandensein einer polarisierten Matrix, die die Richtung der Bewegung vorgibt, gekoppelt ist. Beim muskulären Myosin werden die katalytischen Zentren nun über den Stabteil des Moleküls, der dieses zur gerichteten Selbstassoziation befähigt, räumlich zum dicken Filament geordnet (Huxley, 1957). In Verbindung mit einer entsprechenden Anordnung der Zielmatrix, hier der dünneren Aktinfilamente (Huxley, 1953), kann durch diese Organisation, die in Extremfällen nahezu kristalline Gitter hervorbringt, ein immenser Wirkungsgrad erreicht werden: die Flügelschlagfrequenz von Insekten kann bis zu 1000 Hz betragen. So ist denn auch der Aufbau speziell des Insektenflugmuskels (IFM) ein außergewöhnliches Beispiel für die Ausbildung einer extrem regelmäßigen Anordnung von proteinischen Funktionseinheiten in Zellen (Abb.1-1).

Diese Arbeit soll durch die Untersuchung des für die Selbstassoziation des Insektenmyosins verantwortlichen Molekülteils einen Beitrag zum Verständnis der Mechanismen leisten, die der Ausbildung spezifisch geordneter supramolekularer Strukturen zugrunde liegen.

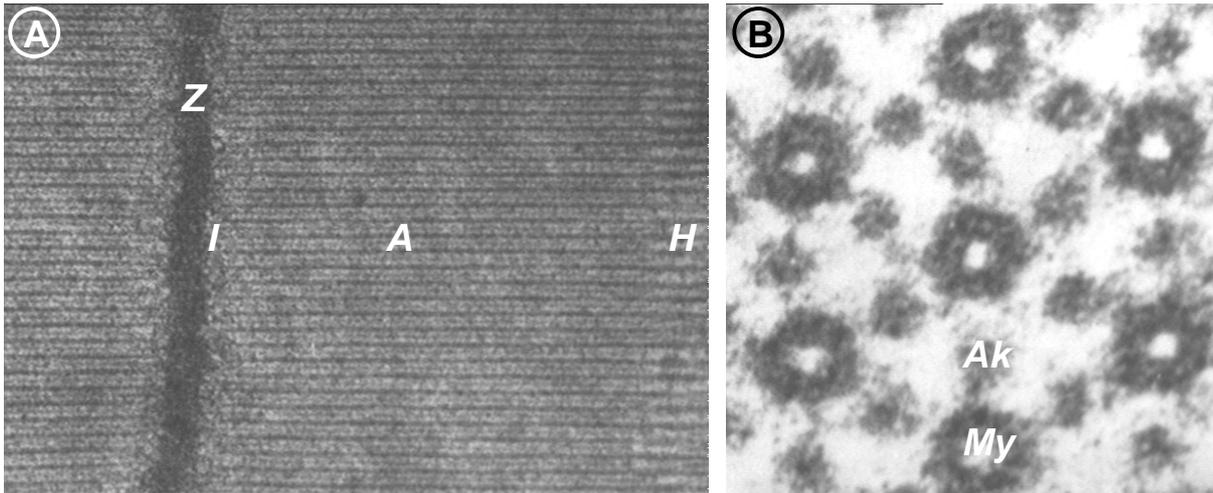


Abb. 1-1: Das Insektensarkomer

A: Längsschnitt *Lethocerus*-Sarkomer. Z: Z-Scheibe; I: I-Band; A: A-Band; H: H-Zone. (aus: Bullard *et al.*, 1977a, verändert)

B: Querschnitt *Musca*-Sarkomer. Ak: Aktinfilament; My: Myosinfilament. (aus: Beinbrech *et al.*, 1988, verändert)

Abb. 1-1 B demonstriert die hexagonal-kristalline Anordnung der Insektenfilamente im Querschnitt, die - neben einem im Vergleich zu Vertebraten-Skelettmuskeln erhöhten Aktin-Myosin-Verhältnis von 3:1 - Ebenen alternierender Filamente produziert. Diese Eigenschaft macht den IFM zu einem unschätzbaren Fundus für ultrastrukturelle Untersuchungen. Der Aufbau des Sarkomers im Querschnitt (Abb. 1-1 A) impliziert die Funktionsweise eines Muskels, die in Huxleys klassischer Theorie des "sliding filament model" niedergelegt ist (Huxley, 1954): Die Polarität der dünnen Aktin- und dicken Myosin-Filamente kehrt sich in der Mitte der Funktionseinheit des Sarkomers um. Myosinköpfchen führen also beiderseits der Aktin-freien H-Zone in den Aktin-Myosin-Überlappungszonen (A-Band) entgegengesetzt gerichtete Bewegungen aus. Durch die Verankerung der dünnen Filamente in den das Sarkomer beidseitig begrenzenden Z-Scheiben wird eine Verkürzung des aus Tausenden von Sarkomereinheiten bestehenden myofibrillären Apparates ermöglicht.

Ausgelöst wird eine solche Kontraktion durch das aus dem T-System (Sarkoplasmatisches Retikulum) freigesetzte Kalzium (Ebashi, 1972), das durch Bindung an Liganden innerhalb der Filamente Änderungen der räumlichen Orientierung der Proteine hervorruft, so dass eine Interaktion der beiden Filamenttypen möglich wird (Ebashi, 1976): Die Kopfdomäne des Myosin greift an den nach Ca^{++} -Bindung an die Regulatorproteine frei zugänglichen Aktinmonomeren an und durchläuft unter ATP-Verbrauch den sog. "Querbrückenzyklus", der in einer Translation des Aktinmonomers relativ zum dicken Filament resultiert (Huxley, 1969).

Das im IFM sehr schmale Myosin-freie I-Band ist eine morphologische Konsequenz aus der speziellen Funktionsweise dieser indirekten Muskeln: Bewegt werden nicht die Flügel selber, sondern das kutikuläre Exoskelett bildet den Ansatzpunkt longitudinaler und dorsoventraler

Muskeln, die den Thorax deformieren. Unterstützt von direkten Steuermuskeln, werden durch diesen schnappenden Verstärkermechanismus die einleitend erwähnten beeindruckenden Schlagfrequenzen der Insektenflügel auch ohne starke Verkürzung des Sarkomers erreicht. Die hohen Oszillationsfrequenzen sind, da ja der gesamte Thoraxkörper in Schwingung versetzt wird, letztlich abhängig von dessen Umfang, so dass die zitierten Spitzenwerte bei den kleinsten Vertretern ihrer Klasse gemessen werden. In diesen Größenordnungen wird allerdings ein anderer Faktor begrenzend: die Zuleitungsfrequenz der innervierenden Neuronen. Auf diesen Umstand gründet sich das Prinzip der "asynchronen" Flugmuskulatur: Während z.B. Heuschrecken, Schaben und Schmetterlinge noch jede Muskelkontraktion durch einen Einzelreiz auslösen, ist bei Bienen, Käfern, einigen Wanzen und eben den Fliegen eine Daueraktivierung des Muskels durch ständig erhöhten intrazellulären Kalzium-Spiegel verwirklicht, die es erlaubt, mehrere Kontraktionen auf einen Reiz hin auszuführen. Die eigentliche Kontraktion wird durch die Tätigkeit des Antagonisten ausgelöst, was man mit dem Begriff der Dehnungsaktivierung bezeichnet (Ruegg & Tregear, 1966).

Diese Art der Aktivierung ist ein Wirkungsprinzip, das - wie auch andere - ursprünglich bei den Insekten beschrieben wurde und später als ein auch bei den Vertebraten verwirklichter Mechanismus gefunden wurde (Steiger, 1971). Die Bedeutung der Dehnungsaktivierung z.B. für die Kontraktion der Herzmuskelzellen wurde unlängst direkt gezeigt (Vemuri *et al.*, 1999). Weitere Beispiele für die Vorreiterrolle dieser Untersuchungsobjekte sind das dritte, die Myosinfilamente mit den Z-Scheiben verbindende Filamentsystem (Ashhurst, 1977; Maruyama, 1997) und die duale Kalzium-Aktivierung (Lehman, 1977). Hier wirkt Kalzium nicht nur durch Bindung an die Regulatorproteine (Weeds & Lowey, 1971) des Aktinfilaments, die zu einer erst lange nach der ersten Beschreibung (Cohen *et al.*, 1972) tatsächlich visualisierten (Lehman *et al.*, 1994) Dislokation des Tropomyosins führt. Zusätzlich ist eine Myosin-gebundene Regulation der Kontraktion verwirklicht. Während bei Mollusken Kalzium direkt an die regulatorischen Leichten Ketten (R-LC's) des Myosins bindet (Kendrick-Jones *et al.*, 1976), findet im IFM eine Ca^{++} -abhängige Phosphorylierung dieser Untereinheiten statt (Lehman *et al.*, 1974), ein Mechanismus, dessen regulatorische Bedeutung auch bei glatten Muskeln der Vertebraten, nicht aber deren quergestreiften Muskeln nachgewiesen ist (Rowe & Kendrick-Jones, 1992). Zusammen mit je einer sogenannten Alkali-LC sind die R-LC's in den Nacken-Regionen der Köpfe eines Dimers aus Schwere Ketten (HC's) lokalisiert. Abb. 1-2 zeigt eine schematische Darstellung des hexameren Proteins:

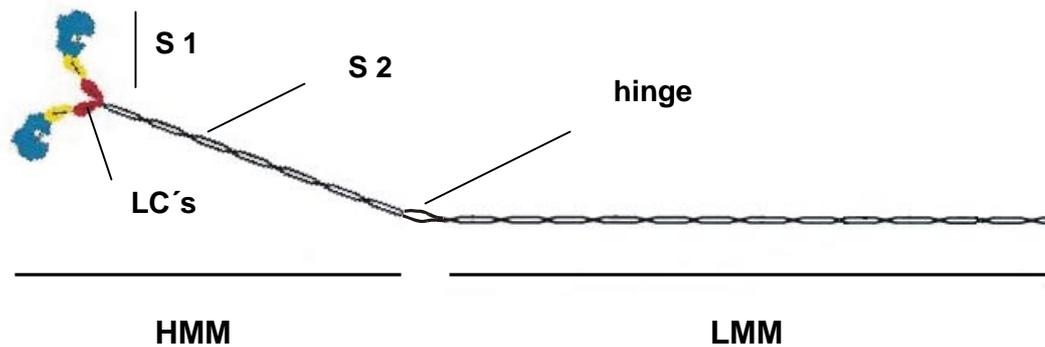


Abb. 1-2: Das Myosinmolekül. Abkürzungen: s. Text; (nach: Liang *et al.*, 1999, verändert)

Die Nomenklatur der Teilabschnitte des Myosins geht auf den Einsatz von Proteasen zur Untersuchung der Substruktur des Moleküls zurück (Lowey *et al.*, 1969). Limitierter tryptischer bzw. chymotryptischer Verdau führt zur Aufspaltung in Untereinheiten, die als Hheavy Mero Myosin (HMM), bestehend aus Subfragment 1 (S 1: Köpfchen) und Subfragment 2 (S 2: „*coiled coil*“: gewundene α -Helices), und Light Mero Myosin (LMM: *coiled coil*) bezeichnet werden. Die bevorzugten Spaltstellen zeichnen sich dabei durch eine aufgelockerte Sekundärstruktur aus, was man durch den Begriff „hinge“ (Scharnier) beschreibt. Die Dimerisierung erfolgt durch die Assoziation der α -helikalen Anteile zweier Schwerer Ketten zum *coiled coil*, das auf ca. $\frac{1}{3}$ des Weges zum C-Terminus (Stabende) den strukturschwachen *hinge*-Bereich aufweist, der es dem HMM-Teil erlaubt, sich während des Kraftzuges vom Filamentkörper zu lösen. Die Aufgabenteilung wird durch Untersuchungen mit diesen Spaltprodukten demonstrativ belegt. So können isolierte S 1-Köpfchen in sog. „in-vitro-motility-assays“ mit Aktin gerichtete Bewegungen induzieren (Ruppel & Spudich, 1995). Das LMM bestimmt die Löslichkeit (Szent-Györgyi, 1953) des Gesamtmoleküls und die gerichtete Zusammenlagerung zum Molekülverbund. Als Determinator dieser Eigenschaften ist der LMM-Abschnitt des Insektenmyosins Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Während man beim Vergleich der Struktur von dünnen Filamenten eine weitgehende Homologie im gesamten Tierreich feststellt, ergeben sich Unterschiede nicht nur in der schon beschriebenen Anordnung von Aktinfilamenten um das dicke Filament, sondern auch in der substrukturellen Organisation der dicken Filamente. Es scheint also, als sei die Spezialisierung einzelner Muskeln eng mit deren dicken Filamenten verknüpft. Trotz diverser Variationen findet man jedoch bei den Myosin-Filamenten unterschiedlichster Herkunft verwandte Eigenschaften, die die Vermutung nahe legen, dass der Architektur dicker Filamente ein gemeinsames Bauprinzip zugrunde liegt.

Ganz allgemein handelt es sich bei den dicken Filamenten um geordnete Zusammenlagerungen von größtenteils fibrösen Proteinen, deren Hauptbestandteil bis auf wenige Ausnahmen das Myosin ist. In Abhängigkeit von der molekularen Organisation der beteiligten Komponenten kommt es so zu einer art- und gewebespezifischen Substruktur von Myosin-

filamenten (Squire, 1981). Morphologische und ultrastrukturelle Differenzierungen sind dabei als Adaptation an die spezialisierten Aufgaben des jeweiligen Muskelgewebes anzusehen. So unterscheidet sich auch die Architektur der dicken Filamente beispielsweise von Insektenflug- und Skelettmuskeln, wie man u.a. aus Beugungsbildern ableiten kann (vgl. Abb. 1-3 A und B). Auch ohne detaillierte Kenntnis der Substruktur der Myosinfilamente darf angenommen werden, dass die distinkte Ausprägung insbesondere des Insektenflugmuskels bzw. dessen Filamente darauf abzielt, die Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Filamenten im Hinblick auf die extrem effiziente Funktion zu optimieren. Die Positionen der Myosinköpfchen, die einen zentralen Parameter der Diversifizierung darstellen, werden durch die molekulare Ordnung der LMM-Anteile im Filamentkörper determiniert.

Mit den bislang zur Verfügung stehenden Techniken der bildhaften Darstellung können die Feinstrukturen im Filamentschaft („backbone“) nur unvollständig aufgelöst werden. Aus diesem Grund versuchte man lange Zeit, aus der regelmäßigen Anordnung von Köpfindichten auf der Filamentoberfläche Rückschlüsse auf die zugrunde liegende Anordnung von Myosinstäben im Schaft des Filaments zu ziehen (Squire, 1973). Informationen über die Formation von regelmäßig angeordneten Proteindichten auf den Filamenten lassen sich aus Beugungsmustern derselben erhalten.

Diskrete Beugungsmuster entstehen allgemein, wenn sich Strahlung an periodisch wiederkehrenden Strukturen bricht. Dabei löscht sich der bei weitem überwiegende Anteil der Streustrahlung aus, ein bestimmter Anteil aber, deren Ausfallswinkel vom periodischen Abstand der beugenden Strukturen abhängt, verstärkt sich gegenseitig und bildet die Beugungsreflexionen. Deren Abstand vom einfallenden Primärstrahl (proportional zum Ablenkungswinkel) ist also ein Maß für den Abstand der beugenden Muster. Da die erwähnte konstruktive Interferenz der gebrochenen Strahlen bei um so kleineren Brechungswinkeln geschieht je größer der periodische Abstand im bestrahlten Objekt ist, stellt das Beugungsmuster ein reziprokes Abbild der periodischen Strukturen im Original dar. Die Wellenlänge der zu verwendenden Strahlung ist dabei abhängig von der Größenordnung der aufzulösenden Strukturen: Im atomaren Bereich, d.h. bei der Analyse makroskopischer Kristalle verwendet man Röntgenstrahlung ($\lambda=0,145$ nm), bei der Untersuchung von mikrokristallinen Strukturen, die einer Ververgrößerung beispielsweise durch das Elektronenmikroskop (EM) bedürfen, werden die EM-Bilder mit Laserstrahlen ($\lambda=633$ nm) analysiert (optische Beugung). Da durch den fibrillären Charakter des Muskelgewebes die gängigen Objekte der Muskelstrukturforschung eine längliche Ausrichtung haben, deren Achse längs zum Sarkomer verläuft, werden deren Beugungsdiagramme per Konvention so ausgerichtet, dass die axialen Anteile auf der „Ordinate“ des Beugungsbildes, dem Meridian, zu liegen kommen, während Abstände quer zur Fibrillenausrichtung auf den sog. Äquator fallen. Abb. 1-3 zeigt Beugungs-

muster von dicken Filamenten verschiedener Spezies, sowie eine dreidimensionale Rekonstruktion von Protein-(=Köpfchen-)dichten auf der Oberfläche von Skorpionfilamenten.

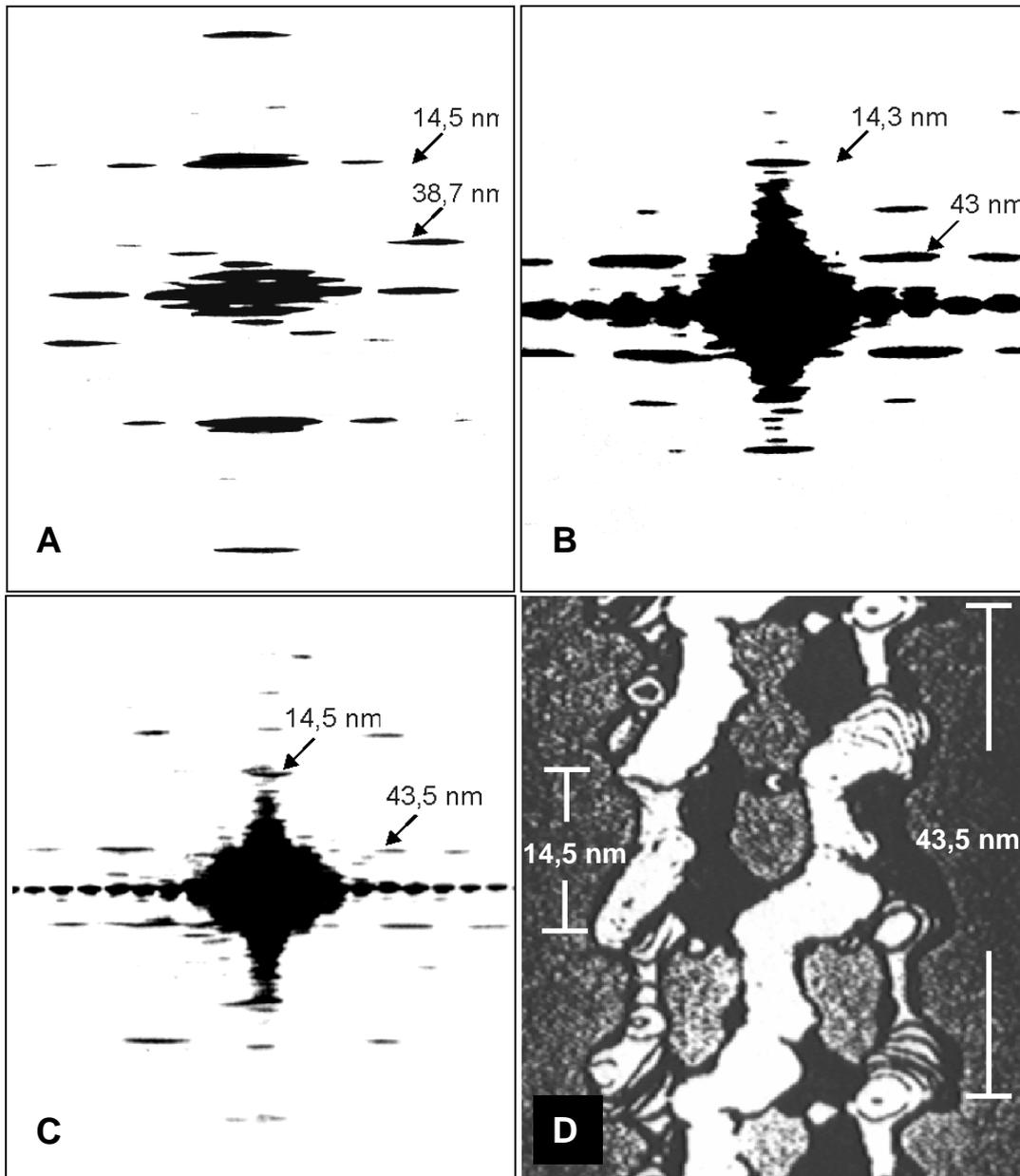


Abb. 1-3: Optische Beugungen dicker Filamente, Rekonstruktion von Köpfchendichten

spezifische Netzebenen-Abstände sind markiert

- A:** Beugungsdiagramm eines *Lethocerus*-Filaments; (aus: Morris *et al.*, 1991, verändert)
- B:** Beugungsdiagramm eines *Rana*-Filaments; (aus: Kensler & Stewart, 1986, verändert)
- C:** Beugungsdiagramm eines *Scorpio*-Filaments; (aus: Kensler *et al.*, 1985, verändert)
- D:** Dreidimensionale Rekonstruktion der Oberflächenmassen eines *Scorpio*-Filaments; (aus: Stewart *et al.*, 1985, verändert). Zu erkennen sind die schraubig um den hier ausgeblendeten Filamentkörper umlaufenden Proteindichten assoziierter Köpfchen, die auf der Grundlage von 14,5 nm entfernten Ebenen eine Strukturwiederholung nach 43,5 nm ausbilden (in diesem Fall gleich dem axialen Abstand der Köpfchenhelices).

Man stellt fest, dass die Hauptdichten, also Köpfchenpositionen, nur in definierten Abständen auf der Oberfläche lokalisiert sind. Meridionale Anteile des Beugungsbildes leiten sich von der axialen Distanz dieser Köpfchenebenen ab, die in allen Fällen nahe verwandt ist und Werte zwischen 14,3 und 14,5 nm annimmt (Tregear *et al.*, 1984). Diese Größe, die auch als „pincipal/fundamental repeat“ bezeichnet wird (hier: Grundperiode oder prinzipielle Wiederholung), verbindet die Organisation von Myosinmolekülen in allen Filamenten. Sie wird in der vorliegenden Arbeit - wenn nicht anders vermerkt - zu 14,5 nm, dem aus Röntgenbeugungen ermittelten Ebenenabstand der Insektenfilamente (Miller & Tregear, 1972), gesetzt. Die nicht („off“-) meridionalen Reflexionen entstehen durch die Kombination von paralleler Versetzung und Ordnung um den Zylinder, also der helikalen Anordnung der Köpfchen, die in Abb. 1-3 D am Beispiel des Skorpion-Muskels herausgefiltert ist. Hier assoziieren sich die Köpfchen entlang der helikalen Symmetrie, so dass vier (Helixanzahl $N = 4$: vierfache Symmetrie) schraubig umlaufende Dichtestränge zu erkennen sind. Den axialen Abstand, in dem ein Strang einen vollständigen Umlauf beschreibt, bezeichnet man als Windungslänge („pitch“= p) der Helix. Der axiale Abstand einzelner Helices (c) ist demnach durch $c = p / N$ zu beschreiben. Im Beugungsbild erscheint im entsprechend reziproken Abstand das erste *off*-meridionale Maximum (Abb. 1-3 C: 43,5 nm). Nicht notwendigerweise stimmt dieser Abstand wie im Falle des Skorpion-Filaments mit der Strukturwiederholung (Abb. 1-3 D) überein.

Reedy etablierte 1967 entscheidende Eckdaten der Symmetrie der Köpfchen auf Filamenten der tropischen Wasserwanze *Lethocerus*, eines Standardobjekts zur Untersuchung asynchroner Flugmuskeln (Reedy, 1967). Er zeigt eine Wiederholung bei 116 nm und starke *off*-meridionale Beugungsintensitäten ganzer Muskeln bei 38,7 nm (s. Abb. 1-3 A), die eindeutig der Myosin-Helix zugeordnet werden können. Die extreme Regelmäßigkeit des Filamentgitters erlaubt ihm hier und in der Folgearbeit (Reedy, 1968), die 3-dimensionale Architektur des IFM-Sarkomers durch Kombination von optischer Diffraktion und strukturellen Beobachtungen zu analysieren. Er bestätigt nicht nur Periode (38,7 nm) und Drehsinn (rechtshändig) der Aktinfilament-Doppelhelix, sondern zeigt eine Sarkomer-übergreifende Regelmäßigkeit von zweisträngigen Köpfchenhelices im Abstand von $c = 38,7$ nm auf den dicken Filamenten. Eine solche helikale Anordnung wurde auch auf isolierten Bienenfilamenten beobachtet (Trombitas & Tigy-Sebes, 1986), so dass eine mustergebende Beteiligung der Aktinmatrix ausgeschlossen werden kann. Diese Übereinstimmung der beiden filament-inhärenten Perioden hat Theorien zur Aktivierung des IFM auf den Weg gebracht (Wray, 1979a) und kann als eine wesentliche Voraussetzung für dessen außerordentliche Effektivität angesehen werden. Bedingt durch die laterale Registrierung der Myosinfilamente im *Lethocerus*-Sarkomer kann Reedy den Drehsinn der Köpfchen-Helices als linksgängig identifizieren und formuliert ein 2fach symmetrisches Köpfchen-Modell, dessen Helices einen *pitch* von 77,3 nm aufweisen.

Wie diese Dichten, die ihrerseits im Querschnitt eine zweiteilige, Y-förmig Gabel beschreiben, durch die Anordnung der Myosinmoleküle im Schaft des Filaments erzeugt werden, ist bis heute nicht klar. Gestützt durch biochemische Untersuchungen, die bei *Lethocerus* einen Myosin Gehalt von 6 Molekülen pro Köpfchen-Ebene anzeigten (Chaplain & Tregear, 1966), entwickelte Squire ein 6-strängiges Modell, das einen Teil seiner Theorie zum generellen Aufbau von Myosin-Filamenten darstellt (Squire, 1972). Tatsächlich kann er theoretisch ableiten, wie ein solcher Aufbau die als „flared X's“ bezeichneten Y-Strukturen generieren kann. Sein Modell fußt im Wesentlichen auf der Annahme gleicher Umgebungen und Packungsgeometrien für jedes Molekül im Rückgrat eines gegebenen Filaments. So sollen symmetrische Filamente entstehen, deren Köpfchenpositionen in verschiedenen Filamenten nahezu identisch sind (Squire, 1971). Variable Parameter sind der Filamentdurchmesser, der myosinfreie Kern und die Neigung von Stäben relativ zur Filamentachse (Squire, 1973).

Im letzten Punkt sind Squires Vorstellungen verwandt mit dem Filament-Modell von Wray, dessen Überlegungen auf der Beobachtung von 4 nm dicken Substrukturen im *backbone* von Invertebraten-Filamenten beruhen (Wray, 1979b). Er kann zeigen, wie so unterschiedliche Helixperiodizitäten wie 30,8 nm des dicken Filaments schneller Hummer-Muskeln, 35 nm (langsame Humtermuskeln) und in Extrapolation 38,7 nm des IFM durch unterschiedliche Neigungswinkel von Subfilamenten ineinander überführbar sind. Er schließt im Falle des IFM auf ein 4fach-symmetrisches Filament (4 parallele Köpfchen-Helices) aus 12 konzentrisch angeordneten Untereinheiten, die im Winkel von $1,8^\circ$ zur Filamentachse geneigt sein müssen. Eine symmetrische Anordnung von 6 Köpfchen kann er aufgrund des sich damit ergebenden Abstandes der Köpfchen vom Filamentkern ausschließen (Wray, 1982). Eine wesentliche Weiterentwicklung der Konzepte Squires besteht in der Annahme der Bündelung von Stäben zu Substrukturen. Damit ist die Forderung einer grundsätzlichen Äquivalenz aller Moleküle aufgehoben. Letztlich kann das bedeuten, dass auch die Vorstellung einer strikten Symmetrie von Köpfchen um das Filament nicht durchzuhalten ist. Diese Aufteilung in Substrukturen ist mittlerweile vielfach belegt, wie Abb. 1-4 zeigt.

Die hier dargestellten Ergebnisse erhält man durch Mittelungs- und Filteroperationen an digitalisierten Querschnittsaufnahmen, die es ermöglichen, regelmäßige Anordnungen hoher Proteindichten zu visualisieren. Das Bauprinzip aus Subfilamenten scheint sich ubiquitär zu bestätigen: Nachdem schon auf der Basis von Röntgenbeugungen eine sechs- bis siebenfache Rotationssymmetrie für quergestreifte Muschel-Muskeln vorgeschlagen worden war (Wray *et al.*, 1975), konnten Substrukturen in der Peripherie des Filamentkörpers in siebenfacher Symmetrie (Abb. 1-4 C) gefunden werden (Craig *et al.*, 1991; Vibert, 1992).

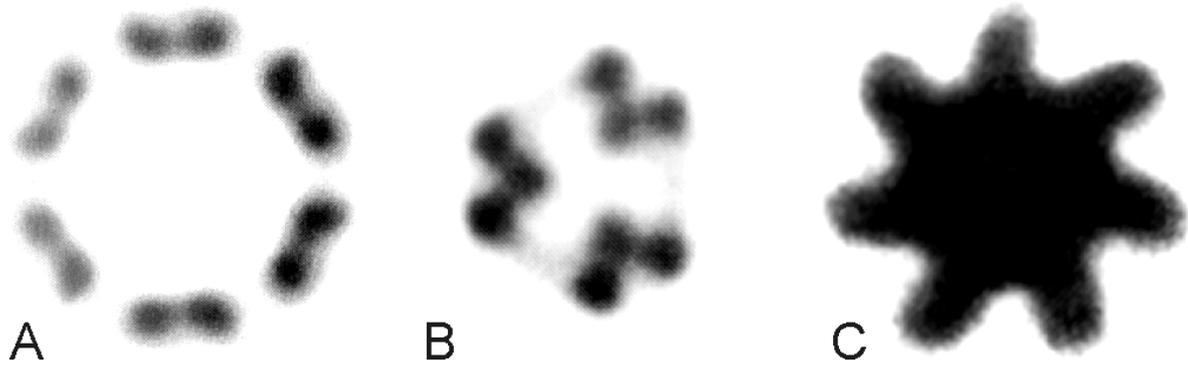


Abb. 1-4: Computer-prozessierte Querschnitte von Myosinfilamenten

A: *Musca*-Filament; (aus: Beinbrech *et al.*, 1988)

B: *Gallus*-Filament; (aus: Ashton *et al.*, 1992)

C: *Placopecten* (Muschel)-Filament; (aus: Craig *et al.*, 1991)

Auch für die Beinmuskeln der Tarantel, deren vierfache Köpfchen-Symmetrie durch Rekonstruktion etabliert worden war (Crowther *et al.*, 1985; Padron *et al.*, 1993), ist eine Vierteilung des Filamentkerns beobachtet worden (Padron *et al.*, 1992). Dass eine subfilamentartige Anordnung auch in Vertebraten die Organisation des Myosins bestimmt, darauf gibt es nach der Beobachtung einer Aufspaltung dieser Filamente in drei Subfilamente (Maw & Rowe, 1980; Pepe, 1982) auch direkte Hinweise: Neben den Querschnittsmittlungen der Arbeitsgruppe Pepe, die sehr deutlich eine Dreiteilung mit neun Untereinheiten (Abb. 1-4 B) demonstrieren (Ashton *et al.*, 1992; Pepe *et al.*, 1986a), kommen auch Stewart und Kensler (Stewart & Kensler, 1986) in einer Rekonstruktionsstudie des Frosch-Skelettmuskels zu dem Schluss, dass die Abweichungen von perfekt helikaler Ordnung, die in ihren Beugungsbildern abzulesen ist, ihre Ursache in einer Bündelung der Moleküle haben sollten.

Die Substrukturen des IFM sind in sechs Paaren um einen zentralen Kern angeordnet, der im elektronenmikroskopischen Querschnitt entweder hohl (Beinbrech *et al.*, 1988) erscheint (Abb. 1-4 A; auch: *Drosophila*), oder je nach Spezies (z.B. *Lethocerus*, *Apis*) mehr oder weniger soliden Charakter zeigt (Beinbrech *et al.*, 1992). Dabei korreliert die Proteinmasse im Kern der soliden Filamente deutlich mit deren Paramyosin-Gehalt (Beinbrech *et al.*, 1985).

Im Gegensatz zu anderen Filamenten hohen Paramyosingehalts wie denen der Muscheln (Elliott & Bennett, 1984) oder auch von *Caenorhabditis* (Epstein *et al.*, 1995), in denen Paramyosin eine eigene Strukturebene bildet, scheint dieses ebenfalls zum *coiled coil* gefaltete Protein also einen variablen Part beim Aufbau der Myosinfilamente des IFM zu spielen. Die Anwesenheit von hohlen wie soliden Filamenten in ein und demselben Sarkomer der Fleischfliege (*Phormia*) bedeutet, dass nur ein geringer Anteil an Paramyosin essentiell für den Strukturaufbau ist, da auch in Insektenmuskeln mit ausschließlich hohlen Filamenten ein

Paramyosin-Gehalt von ca. 3 % gegeben ist. Nur in Gegenwart von Paramyosin und eines weiteren Myosin-assoziierten Proteins des IFM, des Projektins, kann die Länge synthetischer Filamente der Länge von nativen angenähert werden (Kölsch *et al.*, 1995). Die Untersuchung der Myosin-Paramyosin-Interaktion ist essentiell für das Verständnis der molekularen Organisation von Invertebraten-Filamenten (Cohen, 1982; Epstein *et al.*, 1975; Ziegler *et al.*, 1996).

Die Mittelungen von Insektenfilament-Querschnitten (Abb. 1-4 A) bestätigen zwar die Anzahl, nicht aber die von Wray abgeleitete 12fach symmetrische Organisation von Myosin-Strängen. Das von Wray ebenfalls mit einer 12fachen Symmetrie modellierte Myosinfilament schneller Hummer-Muskeln zeigt im gefilterten Querschnitt ebenfalls eine Paarung von Subfilamenten (Ashton *et al.*, 1987). In einem weiteren Punkt weichen ultrastrukturelle Befunde von dessen Modellvorstellungen ab: In weiterführenden Untersuchungen konnte ein achsenparalleler Verlauf der Subfilamente in Bienenfilamenten gezeigt werden (Schmitz *et al.*, 1993). Jedoch erweist sich die Annahme einer Viersträngigkeit als geeignet, die Köpfchendichten auf der Oberfläche isolierter *Lethocerus*-Filamente zu rekonstruieren (Morris *et al.*, 1991). Dies wäre also der erste Fall, in dem die Symmetrie des Filament-Rückgrates (6fach) nicht mit der Anzahl von Köpfchen-Helices übereinstimmt.

Der achsenparallele Verlauf von Subfilamenten schafft zudem weiteren Klärungsbedarf in Bezug auf den "mismatch" von Köpfchenabständen ($3 \cdot 14,5 = 43,5$ nm) und Helix-Abständen (38,7 nm). Ein Modell zur Anordnung von Myosinmolekülen im *backbone* von Insektenfilamenten muss eine Kombination von Versetzungen beinhalten, die diese Rahmenbedingungen erfüllen.

Seit der ersten Herstellung des LMM-Spaltproduktes (Szent-Györgyi, 1953) und der Entdeckung, dass dieser Molekülteil die Aggregationseigenschaften des Moleküls bestimmt (Lowey *et al.*, 1967), versucht man, aus makromolekularen Zusammenlagerungsmustern *in vitro* Rückschlüsse auf die der Filamentbildung zu Grunde liegenden Molekülanordnungen zu ziehen. LMM jedweder Herkunft bildet *in vitro* parakristalline Strukturen, die meist spindelförmig in ihrer Gestalt sind. Sie weisen durch die spezifischen Überlagerungen von Molekülen Bereiche höherer und niedrigerer Proteindichte auf. Regelmäßig wiederkehrende Muster lassen sich durch negative Kontrastierung des Aggregats mit Schwermetallsalzen sichtbar machen. Dabei zeigt sich generell die Tendenz, dass axiale Überschneidungsregionen, die sich als Querstreifung der nadelförmigen Parakristalle darstellen, eine hohe Regelmäßigkeit aufweisen, während die laterale Ordnung der Aggregate relativ schwach ausgeprägt ist. Dies führt unter anderem dazu, dass man speziell im Falle des Vertebraten-LMM recht detaillierte Vorstellungen von den im Filament vorherrschenden Molekülversetzungen entwickelt hat, dass aber über die nächst höhere Organisationsstufe, das Subfilament, sehr wenige Erkenntnisse vorliegen. Aus beiden Informationen ließe sich in Kombination theoretisch die

Filamentstruktur, d.h. die dreidimensionale Anordnung von Molekülen und damit Köpfchenpositionen im nativen Filament ableiten. Im Einklang mit den Beugungsdiagrammen von Vertebratenfilamenten (Abb.1-3 B), die im Sinne einer Köpfchenanordnung im Abstand von 14,5 nm mit einer helikalen Wiederholung von 43,5 nm interpretiert worden waren (Huxley, 1963), sind in zahlreichen Veröffentlichungen Parakristalle dieser LMM-Spezies mit diesen Perioden beschrieben worden (Bennett, 1981; Chowrashi & Pepe, 1977; Katsura & Noda, 1973; Nakamura *et al.*, 1971). Molekulare Modelle der zugrunde liegenden Überlappungen legen übereinstimmend nahe, dass eine der wichtigsten Interaktionen eine 43,5 nm Versetzung sein sollte. Dabei kommen verschiedene Autoren zu dem Schluss, dass ein 43,5 nm versetztes, paralleles Dimer den Grundbaustein der Aggregation bilden sollte (Safer & Pepe, 1980; Strzelecka-Golaszewska *et al.*, 1985). Diese Interpretation wird auch durch andere methodische Ansätze gestützt: So favorisieren Harrington und Burke (Harrington & Burke, 1972) auf der Basis von Sedimentationssays eine solche Interaktionseinheit und darüber hinaus sind entsprechende Dimere direkt visualisiert worden (Davis *et al.*, 1982).

In einer richtungweisenden Publikation folgert Bennett, dass neben einer sukzessiven Parallelversetzung von 43,5 nm den von ihr untersuchten Parakristallen von Vertebraten-LMM ein antiparalleler Baustein mit 84 nm-Überlappung zugrunde liegen sollte (Bennett, 1981). Zusätzlich zu dieser parallelen Versetzung müssen weitere - ebenfalls in Vielfachen von 14,5 - in den polaren Flanken des Myosinfilamentes existieren, die die Köpfchenabstände von 14,5 nm hervorrufen. Dies könnte nach den Modellvorstellungen Squires beispielsweise eine 72,5 nm Versetzung sein (Squire, 1973). Bennett hält eine von 58 nm für möglich, unter anderem, da diese Periodizität in anderen LMM-Parakristallen direkt beobachtet worden war (Chowrashi & Pepe, 1971). Auch eine einfache 14,5 nm-Versetzung würde sowohl in Parakristallen als auch im Filament jene apparente Wiederholung verursachen können.

Diese kurze Übersicht verdeutlicht, dass zwar über die Art der Kombination verschiedener Versetzungen noch immer Unklarheit herrscht, dass selbige aber grundsätzlich integrale Vielfache der prinzipiellen Köpfchendistanz sein sollten.

Die letztendliche Ausprägung der Interaktionen zwischen LMM-Molekülen in Parakristallen und Filamentschäften und deren räumliche Ordnung liegt in der Struktur des *coiled coils* begründet. Diese Feinstruktur orientiert die zur Wechselwirkung mit direkten Nachbarn zur Verfügung stehenden Aminosäure-Reste im Raum und determiniert so nicht nur die energetisch günstigsten Versetzungen sondern auch die Struktur von Subfilamente, also LMM-Bündeln.

Die Vorstellung, dass sich in bestimmten Proteinen, damals als „k-m-e-f“-Proteine (Keratin, Myosin, Epidermin, Fibrinogen) bezeichnet, α -Helices zu einem *coiled coil* winden können, geht auf Crick und Pauling zurück (Crick, 1953b; Pauling & Corey, 1953). Sie stellten unabhängig voneinander die Vermutung auf, dass bestimmte Abweichungen vom Beugungsmuster einer gestreckten α -Helix durch ein Supercoiling entstehen können. Dabei legte Crick

den mathematischen Grundstein (Crick, 1953a), um die Beugungsbilder zweifach symmetrischer Helices als errechnete Beugungsmuster, sog. Fourier-Transformate, herzuleiten. Bei diesen Berechnungen stellt sich als ein strukturbestimmender Faktor ein Parameter der konstituierenden α -Helix heraus, die Anzahl der Aminosäuren (ASen) pro Windung. Dieser Wert ist eng mit der Geometrie der Wasserstoffbrückenbindungen im Kern der Helix entlang des Rückgrates verknüpft, welche die treibende Kraft bei der Ausbildung des coils darstellen. Ausgehend von 3,6 ASen pro Windung der α -Helix kalkuliert Crick einen *coiled coil-pitch* (Windungslänge des Supercoils aus zwei α -Helices) von 18,6 nm. Mit diesen Parametern, insbesondere dem Wert von 3,6, konnte schon zu diesem Zeitpunkt postuliert werden, dass innerhalb der Primärsequenz ein Motiv existieren müsse, das im Mittel an jeder 3,5-ten Position (ein 7 ASe-Motiv also) eine Wechselwirkung zwischen den Helices ermöglicht. Die minimale Drehdifferenz von 0,1 ASe würde somit das Supercoiling verursachen. Der so errechnete *coiled coil-pitch* scheint jedoch keine feste Größe bei der Ausbildung gewundener α -Helices zu sein, es existieren divergierende Ergebnisse für ein und dasselbe Objekt wie z.B. Paramyosin, die sich teils den Vorhersagen Cricks annähern (Elliott *et al.*, 1968) andernfalls aber einen *pitch* von ca. 14 nm ableiten (Cohen & Holmes, 1963). Selbst für den sog. „Leucin-Zipper“, bei dem für einen kurzen Abschnitt Atomkoordinaten vorliegen, errechnen unterschiedliche Autoren entweder einen *pitch* von 18,1 nm (O'Shea *et al.*, 1991) oder nahe 14 nm (Phillips, 1992; Seo & Cohen, 1993). Am Beispiel des Tropomyosins konnte gezeigt werden, dass die *coiled coil*-Geometrie einen hochvariablen Strukturfaktor darstellt (Whitby & Phillips, 2000). Sehr geringe Änderungen der Anzahl von Aminosäuren pro Windung (z.B. 1 %) verursachen dabei große Differenzen (25 %) im *coiled coil-pitch* (Seo & Cohen, 1993). Letztlich sind in diesen Parametern die Interaktionsmöglichkeiten von *coiled coil*-Proteinen zugrunde gelegt.

Das 7-ASe-Motiv der Primärsequenz konnte indes als fundamentales Motiv der Primärstruktur dieser Proteinklasse bestätigt werden. Die Primärsequenzen von Tropomyosin (Parry, 1975), Fibrinogen (Henschen *et al.*, 1977) und α -Keratin (Parry *et al.*, 1977) weisen ein solches wiederkehrendes Muster geladener und hydrophober Aminosäuren auf, bei denen die hydrophoben Aminosäuren im Abstand von 3 bzw. 4 Resten in Position a und d lokalisiert sind (Abb. 1-5 A). Durch die nicht-integrale Anzahl von ASen/Windung bilden diese einen linkshändig helikal gewundenen Saum auf der Oberfläche der α -Helix (Abb. 1-5 B). Entlang dieses hydrophoben Streifen verzahnen sich zwei originäre α -Helices zum *coiled coil*.

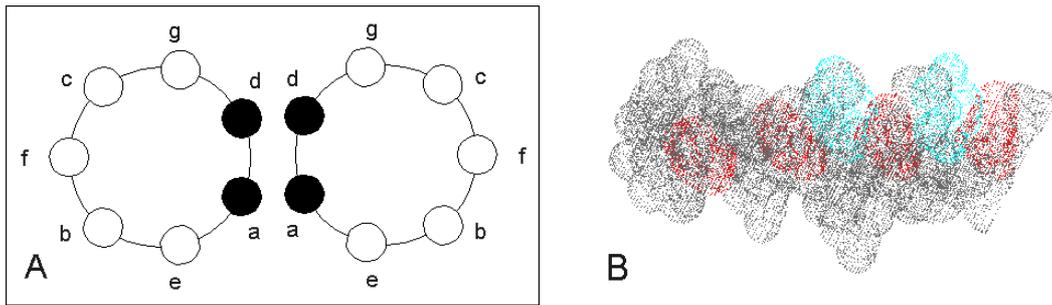


Abb. 1-5: coiled coils

- A:** Projizierter Querschnitt durch das 7-ASE-Motiv eines *coiled coils*: a und d bezeichnen die hydrophoben ASen im Kontaktbereich
- B:** Kalottenmodell eines kurzen Abschnittes eines coils: rot: helikaler Saum hydrophober ASen, blau: negativ geladene ASen; (Quelle: Protein Structure Database unter www.psc.edu)

Nun stellte man sich die Frage, ob auch die möglichen Interaktionen von *coiled coils* anhand der Primärstruktur vorhersagbar seien. McLachlan und Karn unternehmen mit der Veröffentlichung der Sequenz des unc-54-Gens des Nematoden *Caenorhabditis elegans*, das für die Schwere Myosin-Kette kodiert, diesen Versuch (McLachlan & Karn, 1982):

Sie beschreiben, wie im zum coil gefalteten Molekül alternierende Zonen positiver und negativer Ladungen auf der Oberfläche entstehen. Ladungs-Komplementierung kann also eine gerichtete Zusammenlagerung benachbarter Moleküle bewirken. Dabei erstreckt sich die wiederholende Einheit, bestehend aus jeweils drei alternierenden positiv bzw. negativ geladenen Epitopen, über 28 ASen, so dass eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen zwei parallel versetzten Molekülen prinzipiell bei jedem ungeraden Vielfachen von 14 ASen möglich ist. Auf der Basis der reinen Primärsequenz demonstrieren McLachlan und Karn, dass in der Summe besonders starke Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren zweier gestreckter Moleküle auftreten, wenn diese um 98 ASen, bzw. 294 ASen gegeneinander versetzt sind. Ausgehend von einem vertikalen Abstand zweier α -C-Atome in α -helikaler Konformation von 0,1485 nm (Fraser & MacRae, 1973), errechnen sie die korrespondierenden Versetzungsabstände zu eben jenen 14,5 bzw. 43,5 nm, die in Parakristallen und Filamenten vorliegen. Die Analysen der Autoren zeigen darüber hinaus ein 196 ASen umspannendes Motiv negativer Reste; sie lassen die Möglichkeit offen, dass auch entsprechende 29 nm-Interaktionen im Filament auftreten könnten, die über Ladungsbrücken zweiwertiger Ionen wie Magnesium neutralisierbar wären. Es ist also möglich, bestimmte Abfolgen in der Primärsequenz mit den Abständen von Köpfchenebenen des Filaments zu korrelieren. Dabei lassen verschiedenen Motive, die aber sämtlich Vielfachen von 14,5 nm entsprechen, eine Vielzahl von möglichen Wechselwirkungen zu. Letztlich ist die Kenntnis der 3-dimensionalen Ordnung des LMM im Filamentschaft notwendige Voraussetzung für eine detaillierte Modellierung von Interaktionen. Die räumliche Anordnung von Molekülen ist bislang noch für kein Myosinfilament abschließend etabliert.

Das von McLachlan und Karn beschriebene 196 ASe-Motiv korrespondiert nicht nur mit dem Abstand sog. „skip“-Reste (Parry, 1982), die sich nicht in die oben beschriebene regelmäßige Abfolge fügen, sondern auch mit dem Abstand der N-Termini zweier LMM-Peptide (195 ASe), die durch Papain-Verdau aus Hühnchen-Myosin erhalten werden (Chowrashi *et al.*, 1996). Diese im Arbeitskreis Pepe, Philadelphia, gefundenen, je ca. 13 kDa schweren Peptide bilden unabhängig voneinander nahezu kristalline Aggregate und lassen eine Unterteilung des LMM in funktionelle Einheiten vermuten. Dies führte zur Designierung von 195-ASe-Zonen innerhalb des Stabes, die von den Autoren in fortlaufender Nummerierung vom C-Terminus aufwärts mit MHC_n bezeichnet werden (Abb. 1-6 A). Sollten diese Peptide von besonderer Signifikanz für das Aggregationsverhalten des Myosins sein, so könnte die ausgeprägte Homologie zu den entsprechenden Abschnitten der *Drosophila*-Sequenz (55,6 % bzw. 59,2 %) eine ubiquitäre Bedeutung dieser Regionen für die Eigenschaften des LMM andeuten. Andererseits könnten Sequenzunterschiede gerade in diesen Bereichen zur artspezifischen Ausprägung dicker Filamente beitragen.

Die funktionelle Bedeutung einzelner Sequenzabschnitte des LMM ist bislang nur unvollständig charakterisiert. So konnten beispielsweise noch keine Domänen identifiziert werden, die mit der spezifischen Struktur dicker Filamente einzelner Tierklassen in Verbindung gebracht werden können. In Kooperation mit dem Arbeitskreis Pepe sollten auf der Grundlage der Unterteilung des LMM in 195 ASe lange Einheiten vergleichende Untersuchungen zwischen Vertebraten- und Insekten-LMM angegangen werden.

Parallelexperimente zwischen LMM-Varianten verschiedener Spezies sind praktisch nur über den methodischen Ansatz der heterologen Expression von Protein-Fragmenten möglich. Er erlaubt eine Sezierung des zu untersuchenden Objekts in definierte Teilbereiche und damit eine Funktionsanalyse von Subdomänen wie den MHC-Abschnitten. Für die Arbeit an Insektenmuskeln steht mit *Drosophila melanogaster* einer der genetisch best charakterisierten Organismen überhaupt zur Verfügung. Die muskulären Myosin-Isoformen von *Drosophila* werden sämtlich durch ein einziges Gen kodiert, das jedoch durch alternatives splicing theoretisch in der Lage ist, 480 verschiedene Varianten zu kodieren (George *et al.*, 1989).

In Bezug auf die LMM-Domäne stehen jedoch lediglich zwei Isoformen zur Auswahl, die sich im nicht helikalen C-Terminus unterscheiden (Abb. 1-6 A). In der Embryonalphase der Entwicklung, in der lediglich solide Filamente auftreten, konnten zwei reife mRNA's als Transkriptionsprodukte des einzigen Myosingens nachgewiesen werden (Rozek & Davidson, 1983). Beide generieren Proteine, die am C-Terminus einen durch das Exon 19 kodierten nicht helikalen Abschnitt von 27 Aminosäuren aufweisen. Zusätzliche mRNAs, die durch alternatives splicing einen modifizierten C-Terminus kodieren, treten erst in der Adultphase auf. Sie generieren durch Verwendung des Exons 18 Isoformen, bei denen dieses Epitop

durch die Aminosäure Isoleucin ersetzt ist (Bernstein *et al.*, 1986). Im Adult-Stadium erscheinen die Filamente im Querschnitt tubulär (Reedy & Beall, 1993).

Dieser Umstand gab zu der Arbeitshypothese Anlass, dass Myosin-Isoformen, die sich in ihrer Bindung an Paramyosin unterscheiden, zur muskelspezifischen Ausprägung dicker Filamente beitragen. Zudem weist der durch Exon 19 kodierte Bereich mit der Sequenz: PRAT**S**VRPQFDGLAFPPRFDLAPENEF die unterlegt dargestellte Konsensus-Sequenz für Protein-Kinase C auf (Quelle: Prosite unter www.expasy.ch). An dieser Stelle wäre also die Möglichkeit einer Regulation von Aggregations- und Interaktionseigenschaften über eine Phosphorylierung gegeben. Der Einfluss einer möglichen Phosphorylierung auf die Eigenschaften eines Expressionsproduktes lässt sich über molekularbiologische Methoden durch den Austausch des potentiell phosphorylierbaren Restes durch eine negativ geladenen Aminosäure simulieren.

Die heterologe Expression von LMM-Fragmenten ermöglicht die spezifische Untersuchung unterschiedlicher Sequenzabschnitte des aggregationsfähigen Teils des Insekten-Myosins: a) der 195 ASen umspannende MHC-Subdomänen, b) unterschiedlicher C-Termini und c) phosphorylierbarer Epitope. Daher sollte zunächst ein Expressionssystem etabliert werden, das es erlaubt, eine Anzahl unterschiedlicher Teilstücke dieses Molekülteils rekombinant herzustellen. Es sollten mit Hilfe dieses Systems 6 verschiedene Proteine nativer Primärsequenz exprimiert werden, die sich durch alternative Wahl ihrer N-Termini (MHC3-N bzw. MHC2-N) bzw. C-Termini (MHC1-C, Exon18-C bzw. Exon19-C) unterscheiden (Abb. 1-6 B). Der MHC1-Abschnitt endet 5 ASen (Sequenz: GASPA) vor dem letzten durch Exon 17 kodierten Rest, so dass sich die C-terminal deletierten Fragmente lediglich durch eine Differenz von 6 Aminosäuren von den Exon 18 einschließenden Formen unterscheiden.

Darüber hinaus sollten Mutanten der Exon 19- Formen erzeugt werden, in denen das potentiell phosphorylierbare Serin durch einen Glutamat-Rest ersetzt wurde, um eine mögliche sekundäre Modifikation zu simulieren (Abb. 1-6 B):

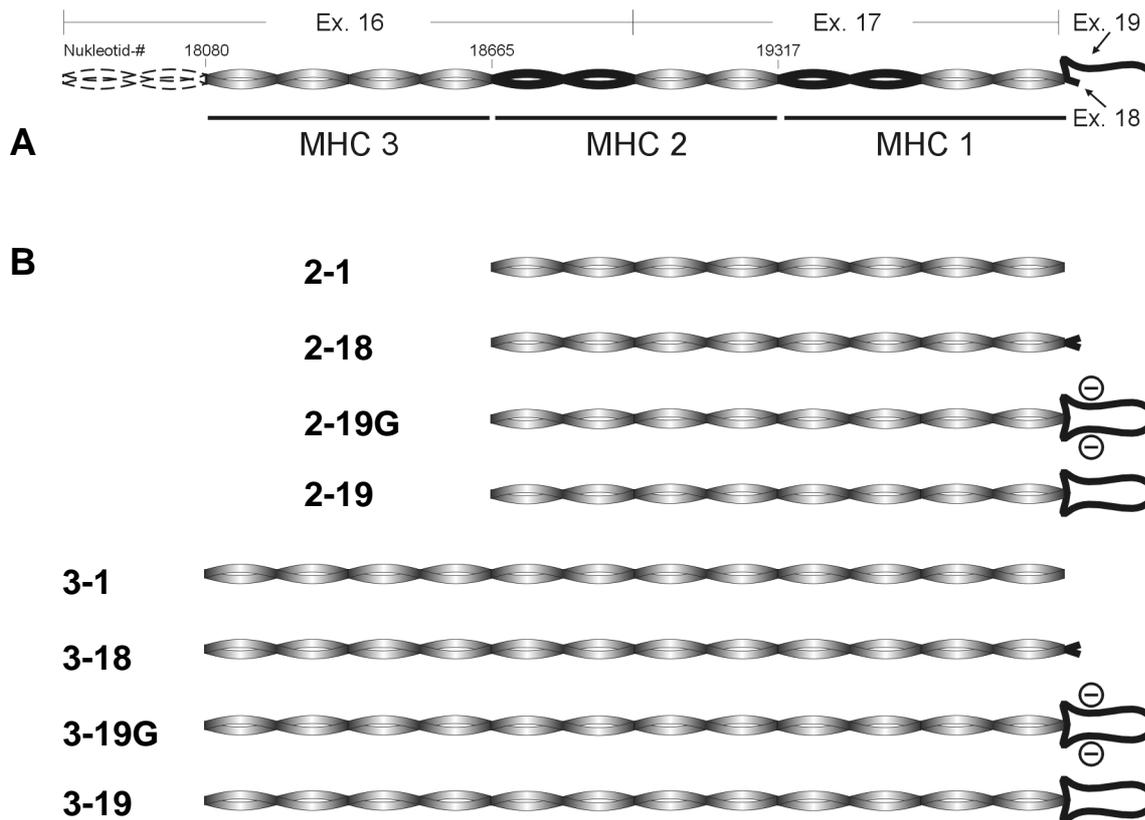


Abb. 1-6: Fragmente des Insekten-LMM

A: Lokalisation und Nomenklatur von LMM-Abschnitten. Schematische Darstellung der Exon-Struktur des für die LMM-Domäne kodierenden Bereichs von *Drosophila* (nach: George *et al.*, 1989). Die *hinge*-Region wird durch das Exon 15 kodiert. Die Nukleotidnummern des Start-Triplets für die je 195 AS langen Abschnitte MHC 1, 2 und 3 sind angegeben. Alternative C-Termini sind unproportional dargestellt. Die den von Chowrashi *et al.* (1996) erhaltenen Peptiden entsprechenden Sequenzbereiche sind innerhalb des *coiled coils* schwarz hervorgehoben.

B: Expressionsprodukte. Schematische Darstellung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit exprimierten LMM-Fragmente. Sequenzfolge an den Termini: N-Termini: MHC3: VEEEAEG..; MHC2: AALEEA..; C-Termini: MHC1: ..RAGSVGR; Exon 18: ..RGASPAI; Exon 19: ..LAPENEF

Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter Verwendung dieser Fragmente des *Drosophila*-Myosins untersucht werden, ob das Insekten-LMM distinkte Eigenschaften aufweist, die die Struktur der dicken Filamente von Insektenflugmuskeln mitbestimmen. Im Einzelnen standen dabei folgende Fragestellungen im Mittelpunkt:

- 1) Weist das Insekten-LMM Eigenschaften auf, die es von anderen LMM-Spezies unterscheidet? Können diese Eigenschaften zur artspezifischen Ausbildung der dicken Filamente beitragen?
- 2) Unterscheiden sich die Fragmente hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften wie Löslichkeit und Strukturparameter?
- 3) Welche Aufgaben kommen den unterschiedlichen C-Termini verschiedener Myosin-Isoformen zu?

-
- 4) Gibt es Domänen innerhalb der LMM-Sequenz von *Drosophila*, die bevorzugt mit Myosin-assoziierten Proteinen interagieren? Kann darüber die Rolle dieser akzessorischen Proteine bei der Filamentbildung näher charakterisiert werden?
 - 5) Können bestimmte Zielsequenzen besonders innerhalb des C-Terminus bestimmter Isoformen phosphoryliert werden und welchen Effekt hat eine etwaige Phosphorylierung?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Molekularbiologie

Thermocycler	PE9600	Perkin Elmer Inc., Wellesley MA, USA
Inkubationsschüttler	Innova 4000	New Brunswick Scientific Inc., Edison NJ, USA
Inkubationsschrank	BB16	Heräus, Hanau
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Autoklav	Varioklav 300-ET-2	H + P Labortechnik, Oberschleißheim

Proteinreinigung und -analyse

FPLC-Anlage	Steuergerät GP250 plus	Amersham Biosciences, Freiburg
	Pumpe P500	Amersham Biosciences, Freiburg
	Säule MonoQ HR 10/10	Amersham Biosciences, Freiburg
	Monitor UV-1	Amersham Biosciences, Freiburg
	Fraktionssammler 100	Amersham Biosciences, Freiburg
Fraktionssammler	2110	Bio-Rad, München
Peristaltikpumpe	P3	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Ultraschallgerät	Sonorex	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Spektropolarimeter	CD 6	Jobin Yvon, Longjumeau, Frankreich
Bedampfungsanlage	BAE 300	Balzers GmbH, Bingen-Kempton
Airbrush-Pistole	Airbrush A	Efbe airbrush, Laatzen
Photometer	UV-Vis 181	Hitachi Corp., Japan
	Biochrom 4060	Amersham Biosciences, Freiburg
ELISA-Wascher	MRW	Dynatech, Denkendorf
ELISA-Reader	MR 4000	Dynatech, Denkendorf

Elektrophorese

Elektrophoresekammern	Protean II xi	Bio-Rad, München
	2050 Midget	LKB, Bromma, Schweden
	S2 BRL	GIBCO BRL, Gaithersburg MD, USA
	H5 BRL	GIBCO BRL, Gaithersburg MD, USA
Spannungsquellen	4000 BRL	GIBCO BRL, Gaithersburg MD, USA
	ECPS 3000/150	Pharmacia, Uppsala, Schweden
	Bio-Rad 500/200	Bio-Rad, München
Blotkammer	TransBlot SD	Bio-Rad, München
Geltrockner	543	Bio-Rad, München

Zentrifugen

Ultrazentrifugen	L-70K	Beckman Coulter Inc., Fullerton CA, USA
	OTD 65	Sorvall, Du Pont GmbH, Bad Homburg
	L8-70M	Beckmann, München
Kühlzentrifuge	RC 2-B	Sorvall, Du Pont GmbH, Bad Homburg
Tischzentrifugen	Labofuge III	Heräus, Osterode
	5415 C	Eppendorf, Hamburg

Mikroskope

Elektronenmikroskope	EM 201	Philips, Eindhoven, Niederlande
	EM 401	Philips, Eindhoven, Niederlande
	CM 120	Philips, Eindhoven, Niederlande
	EM 9 A	Zeiss, Oberkochen
Phasenkontrastmikroskop	Axioskop 50	Zeiss, Oberkochen

Dokumentation

UV-Transilluminator	IL-350 M	Bachofer, Reutlingen
Polaroidkamera	MP 4	Polaroid, Offenbach
Autoradiographie	BioMax-System	Eastman Kodak Co., Rochester NY, USA
Bio-Imaging-System	Fuji-BAS-1500	Raytest, Straubenhardt
Laser-Densitometer	Personal Densitometer	Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, USA

Sonstige

Ultramikrotom	Cryocut E	Reichert-Jung, Bensheim
---------------	-----------	-------------------------

2.1.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Merck (Darmstadt), Sigma / Fluka / Riedel-de Haën (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), Serva (Heidelberg), Roche (Mannheim), ICN (Meckenheim), Bio-Rad (München).

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit A. bid. angesetzt.

Spezial-Reagenzien wurden wie folgt bezogen:

Avidin-POD	Vector Laboratories Inc., Burlingame CA, USA
Biotin-7-NHS	Roche, Mannheim
Didodecyldimethyl-Ammoniumbromid	Eastman Kodak Co., Rochester NY, USA
Dilaurylphosphatidylcholin	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster AL, USA
Distearyldimethyl-Ammoniumchlorid	Kao Atlas Corp., Tokyo, Japan
Dulbecco´s PBS	Sigma, Deisenhofen
Füllertinte	Pelikan GmbH, Hannover
Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell
Radiochemikalien	
$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{-dATP}$	NEN Life Science Products, Inc., Boston MA, USA
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim
$^{32}\text{P}\text{-ortho-Phosphat}$	Amersham Biosciences, Freiburg
Sequenzier-Chemikalien	
Harnstoff	Bio-Rad, München
LongRanger®-Gellösung, GelSlick®- Antihaft-Lösung, 10 x TBE	FMC Bioproducts, Biozym Diagnostik GmbH, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-POD	Sigma, Deisenhofen

2.1.3 Molekularbiologisches Material

Kits für molekularbiologische Arbeiten:

Plasmid-MiniPrep, Plasmid-MidiPrep, DNA-cleanup, PCR-cleanup	Promega Corp., Madison WI, USA
CircumVent™ Sequenzier-Kit	New England Biolabs Inc., Beverly MA, USA

Enzyme:

Eco RI, Hind III, T7-Ligase	Boehringer Mannheim Biochemicals, Roche, Mannheim
Pfu-Polymerase	Stratagene, La Jolla CA, USA
alle übrigen	New England Biolabs Inc., Beverly MA, USA

Bakterienstämme und Phagen:

BRL-Stämme	Novagen, EMD Biosciences Inc., Merck KgaA, Darmstadt
RZ 1032, JM 109, VCS-M13	Stratagene, La Jolla CA, USA

Plasmide:

pET 23a(+)	Novagen, EMD Biosciences Inc., Merck KgaA, Darmstadt
pUC119	United States Biochemicals Corp., Cleveland OH, USA
pMal	New England Biolabs, Inc., Beverly MA, USA
pTrcHis	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Primer:

AMITOF Biotech, Brighton MA, USA

Sonstiges :

Kultur- und Platten-Zusätze	Difco, Detroit MI, USA
dNTPs	Amersham Biosciences, Freiburg

2.1.4 Sonstige Materialien

Affinitätsmatrices	Ni-NTA-Agarose	Qiagen GmbH, Hilden und Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Entsalzungssäulen	PD 10	Amersham Biosciences, Freiburg
ELISA-Platten	F-Form	Greiner, Nürtingen
Sterilfilter	Zellulose-Ac. 0,45 µm	Nalgene, Rochester NY, USA
Dialyseschlauch	Servapor; 10 kDa	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Konzentratoren	centriplus®, 10 kDa	Amicon Inc., Beverly MA, USA
Nitrocellulose	BA 45	Schleicher & Schuell, Dassel
Software	CRISP	Version 2.0 für Windows
	Image Tool	Version 2.0 für Windows
	TINA	Version 2.09 für Windows NT
	Spectra	für Unix-Workstation

2.1.5 Versuchstiere

Wildtyp-Fliegen der Arten *Drosophila melanogaster*, *Phormia terrae-novae*, *Sarcophaga bulbata* und *Musca domestica* stammten aus der Zucht des Instituts für Allgemeine Zoologie und Genetik der WWU, Münster.

2.2 Klonierung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten definierte Abschnitte des *Drosophila*-Myosin-Gens in Expressionsvektoren kloniert werden. Ist die Zielsequenz bekannt und eine diese enthaltene DNA-Matrize („template“) vorhanden, so lassen sich ganz gerichtet bestimmte Sequenzen aus dem Original durch die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) kopieren und amplifizieren. Im Zuge dieser Reaktion kann das zu amplifizierende Fragment u.a. mit Restriktions-Schnittstellen an den Enden versehen werden, was eine gerichtete Klonierung des Produktes in Vektoren ermöglicht. Als *templates* dienten hier die Plasmide pNB40 und CD305, die uns freundlicherweise von Prof. Sanford Bernstein, University of California San Diego, bzw. Dr. Rod Brundage, University of Pennsylvania, zur Verfügung gestellt wurden.

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können in einem Agarosegel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Als Längenmarker werden DNA-Gemische mit bekannten Fragmentgrößen verwendet.

Die Gellösung wurde angesetzt, indem eine von der zu erwartenden Fragmentgröße abhängige Menge Agarose (1-2 % (w/v)) in 1fach TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst wurde, bevor dieser Lösung Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml Gel zugesetzt wurde. Das Gel wurde im Gelschlitten 15 Minuten lang ausgehärtet; ein Spacer-Kamm formt dabei die Probenaschen. Die DNA-Proben wurden mit 6fach konzentriertem Probenauftragspuffer (2 µl/10µl Probe) versetzt, in die Taschen pipettiert und bei 9 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt bis die Wanderungsstrecke der Farbstoffe des Probenauftragspuffers eine ausreichende Separation der Banden signalisierten. Als Größenmarker diente Hind III-verdaute λ-DNA bzw. der "1 kB-Marker". Zur Konzentrationsabschätzung von DNA-Proben wurde ein optischer Vergleich der Bandenintensität mit den Fragment-Banden des λ-DNA-Markers angestellt, von dem jeweils exakt 1 µg aufgetragen wurde. Präparative Gele wurden mit LMP (low melting point)- Agarose angesetzt und mit der Hälfte der üblichen Spannung gefahren, um zu starke Erwärmung zu vermeiden. Die Ziel-Bande wurde ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des DNA-cleanup Kits (Promega) isoliert.

Lösungen:

50fach TAE-Puffer:	2 M Tris-Base 2 M Essigsäure 50 mM EDTA (1:10 aus 0,5 M Stammlösung, pH 8,0)
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml Ethidiumbromid
6fach Probenauftragspuffer:	30 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol

2.2.2 PCR

Es sei hier nur kurz das Prinzip der PCR- Reaktion erläutert, um den Hintergrund experimenteller Modifikationen zu verdeutlichen: Für die hier relevanten Applikationen werden in einem Reaktionsansatz kombiniert: a) das DNA-*template* b) zwei als Primer bezeichnete Oligonukleotide, die einen kurzen Abschnitt der gewünschten Anfangssequenz ("upstream"-Primer; vorgeschaltet) bzw. der komplementären Endsequenz ("downstream"-Primer; nachgeschaltet) sowie mindestens eine Restriktionsstelle einschließlich zusätzlicher Nukleotide enthalten. Diese dienen nach Hybridisierung mit der Zielsequenz als Andockstelle („priming“) für die c) thermostabile DNA-Polymerase, die entsprechend der Matrize einen neuen Einzelstrang synthetisiert unter Verwendung der zugegebenen d) dd(didesoxy)Nukleotide. Die enzymespezifischen Reaktionsbedingungen werden durch e) konzentrierte Puffer- und ggf. Ionenlösungen eingestellt.

Die einzelnen Teilabschnitte der Reaktion finden bei unterschiedlichen Temperaturen statt, auf die der Ansatz innerhalb kürzester Zeit durch einen Thermocycler eingestellt werden kann. Das Aufschmelzen der Doppelstränge geschieht bei 90°C, die Hybridisierung der Oligonukleotide ("annealing") erfolgt bei Primer-spezifischen Temperaturen zwischen 40 und 65°C, und die Strangverlängerung (Elongation) durch die Polymerase bei einer für das Enzym charakteristischen Optimaltemperatur (gewöhnlich um 65-72°C). Die beschriebene Abfolge von Inkubationstemperaturen wird zyklisch zwischen 20 und 30 mal wiederholt, wobei zunehmend mehr Doppelstränge der gewünschten Länge entstehen, da die Primer in zunehmendem Maße an neu synthetisierte Einzelstränge hybridisieren.

Entscheidend für die Qualität der PCR-Produkte sind eine Reihe von Parametern:

An erster Stelle ist hier die Fehlerrate der verwendeten Polymerase zu nennen, die in beträchtlichen Grenzen schwanken kann. Die zur Klonierung in den pET-Vektor (liefert die letztendlich für die vorgestellten Experimente verwendeten Expressionsprodukte) hergestellten PCR-Fragmente wurden sämtlich unter Verwendung von Pfu-Polymerase synthetisiert. Dieses Enzym ist unter den thermostabilen DNA-Polymerasen dasjenige mit der geringsten Fehlerrate (Cline *et al.*, 1996). Der Hersteller Stratagene gibt einen Wert von 2,6 % mutierter PCR-Produkte verglichen mit z.B. 16 % für das Standard-Enzym Taq-Polymerase an. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase wird durch das verwendete Enzym kein zusätzliches Adenin am 5'-Ende des synthetisierten Einzelstranges angefügt. Diese Eigenschaft ist bei der hier angewendeten Klonierungsstrategie von besonderem Nutzen (s. Kap. 2.3.4). Ein Nachteil der hohen Genauigkeit (d.h. "proofreading"-Aktivität) dieses Enzyms ist eine verminderte Ausbeute an PCR-Produkt. Zwar kann man durch eine Erniedrigung der Hybridisierungstemperatur eine Steigerung der Ausbeute erzielen, jedoch geht diese zwangsläufig auf Kosten der Spezifität der Hybridisierung, so dass Fehlprodukte entstehen können. Ein weiterer Parameter, der hier von besonderer Bedeutung ist, ist das Primer-*template*-Verhältnis.

Die PCR-Bedingungen wurden unter Berücksichtigung der o.g. Zusammenhänge stellvertretend anhand eines Fragmentes optimiert, das in besonderem Maße unspezifische PCR-Produkte lieferte. Als Startbedingung für die Hybridisierungs-Temperatur wurden computer-gestützte Primer-*template*-Analysen (software: OLIGO) gewählt. Tab. 2-1 und Abb. 2-1 zeigen beispielhaft ein Experiment zur Optimierung der PCR für das Fragment 3-19; Eine Hybridisierungs-Temperatur von 64,5°C hatte sich zuvor als günstig herausgestellt. Im Einzelnen werden hier die Parameter Primer-Konzentration und Mg⁺⁺-Konzentration variiert.

Tab. 2-1: Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen für das Fragment 3-19

Bedingungen: Thermocycler PE 9600; dünnwandige Reaktionsgefäße; Schmelzen: 90°C, 1 min; *annealing*: 64,5°C, 1,5 min; Elongation: 72°C, 1,5 min; 25 Zyklen. (Angaben in µl)

	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K
Puffer # 1		10		10	10	10	10	10	10	10
Puffer # 2	10		10							
MgCl ₂ (25 mM)						4	8		4	8
Primer # 1 (2µM) µM)	10	10	5	5	5	5	5	2,5	2,5	2,5
Primer # 2 (2 µM)	10	10	5	5	5	5	5	2,5	2,5	2,5
Nukleot.-Mix (je 10 mM)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
template (0,02 µM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pfu.-Polym.(5u/µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ O	66	66	76	76	76	72	68	81	77	73

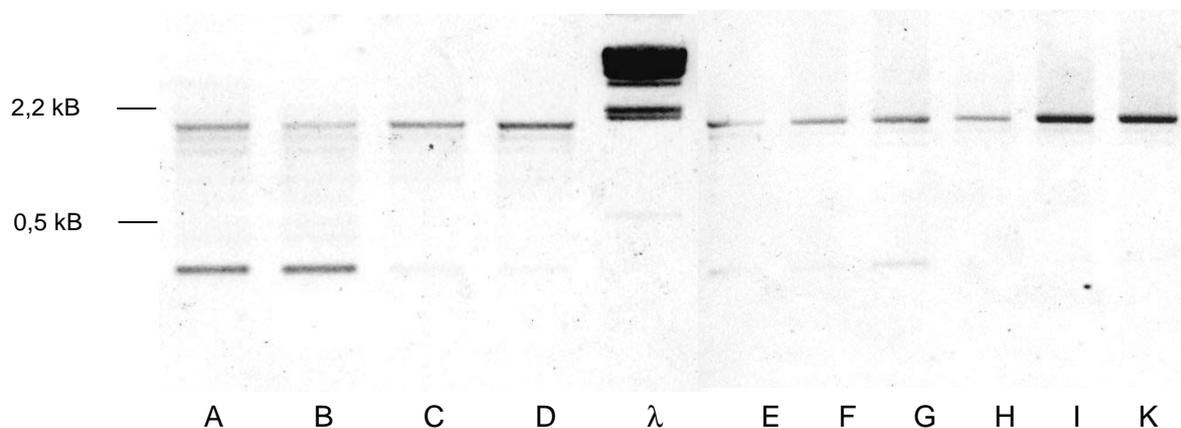


Abb. 2-1: 1,5 % Agarose-Gel der in Tab. 2-1 zusammengefassten Reaktionen;

Auftrag: jeweils 10 µl der PCR-Ansätze A-K aus Tab. 2-1; λ = λ-Marker

Lösungen:

Puffer #1 (Fa. Stratagene):
 200 mM Tris pH 8,2
 100 mM KCl
 60 mM (NH₄)₂SO₄
 20 mM MgCl₂
 0,1% (v/v) Triton X-100
 100 µg/ml BSA

Puffer # 2 (Fa. Stratagene):
 200 mM Tris pH 8,2
 100 mM KCl
 60 mM (NH₄)₂SO₄
 15 mM MgCl₂
 0,1% (v/v) Triton X-100

Zwar lassen sich die Bedingungen für ein bestimmtes Produkt im Hinblick auf Ausbeute und Produktspezifität optimieren, jedoch kann eine Verunreinigung mit durch Fehl-*priming* entstandenen PCR-Produkten nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher wurde das Ziel-Fragment mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aus dem Reaktionsgemisch gereinigt, was gleichzeitig eine Entfernung der restlichen Komponenten ermöglicht. Hierzu wurde das PCR-cleanup Kit der Fa. Promega verwendet: Der gesamte Ansatz wurde auf ein 1,5 % Agarose (niedriger Schmelzpunkt von 30°C) - Gel aufgetragen, welches, um eine möglichst hohe Trennleistung zu erzielen, bei möglichst geringer Spannung (50 V) und um das Doppelte verlängerter Laufzeit analytischer Gele gefahren wurde. Die durch langwellige UV-Bestrahlung kurz sichtbar gemachte Bande wurde ausgeschnitten und die DNA nach Erhitzen des Gelstücks über eine Säulenprozedur (DNA-cleanup-Kit der Fa. Promega) extrahiert. Nachfolgend mussten die Restriktionsstellen zum Einbau in den Plasmidvektor geschnitten werden.

2.2.3 Restriktionsverdau

Sämtliche Restriktionsverdauungen wurden mit produktspezifischen Pufferkonzentraten und BSA-Supplementierungen nach Herstellerangaben angesetzt. Hierzu wird zunächst die Konzentration der zu verdauenden DNA gelelektrophoretisch durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen der Marker-Banden abgeschätzt, um die benötigte Mindest-Enzym-Aktivität zu bestimmen. Gewöhnlich wurde mit mindestens zweifachem Aktivitätsüberschuss gearbeitet. Beim Ansatz des Verdauens ist neben enzymespezifischen Einschränkungen und Besonderheiten (vgl. Datenblatt) zu beachten, dass die Glycerinkonzentration im Reaktionsgemisch durch Zugabe der Enzymstammlösung 5 % nicht überschreitet.

Im Anschluss an den Verdau wurde die DNA unter Verwendung entweder des PCR-cleanup- oder DNA-cleanup-Kits (Promega) gereinigt und die Konzentration über Gelelektrophorese bestimmt. Im Falle der zur Klonierung in den pET-Vektor hergestellten PCR-Produkte musste lediglich das *downstream* gelegene Ende des „inserts“ (Einschubfragment) durch BamH I verdaut werden, da ein Nde I-Verdau einer endständigen Schnittstelle nicht zuverlässig möglich ist; dieses Enzym benötigt einen Überhang von mindestens 12 Basenpaaren. Daher wurde dieses Ende über eine „blunt-end“-Ligation (Verbindung stumpfer DNA-Enden) an die speziell vorbereitete Vektorsequenz (s. Kap. 2.3.4.1) fusioniert. Voraussetzung ist dabei die erwähnte Verwendung von Pfu-Polymerase, die im Gegensatz zur Taq-Polymerase stumpfe Enden synthetisiert.

2.2.4 Plasmidpräparation

Glycerin-Stammlösungen Plasmid-tragender Transformanten wurden vor Präparation der Plasmide auf LB-Platten (+ Antibiotikum) durch Ausstrich vereinzelt.

Die jeweiligen Plasmide, deren Vektor-integriertes Resistenzgen die Selektion auf transformierte Zellen ermöglicht, wurden in ausreichender Menge aus einer Übernachtskultur eines Klons in LB (+ Antibiotikum, in der Regel Ampicillin) gereinigt. Hierzu wurde das Plasmidprep-Kit der Fa. Promega verwendet. Auch bei dieser Routine wird die DNA über eine Adsorption an eine Säulenmatrix aus dem *E.coli*-Zellysats (alkalische Lyse) gewonnen. Das zur Gewinnung von mehreren µg Plasmid benötigte Kulturvolumen ist abhängig von der Natur des Vektors, speziell des vorhandenen Replikationsursprungs; dieser bestimmt die Anzahl der Kopien des Plasmids pro Zelle. Sogenannte "high copy"-Plasmide tragen z.B. den Replikationsursprung oriRI, der integraler Bestandteil von Vektoren wie pUC, pTrc und p340 ist. Der f1-Ursprung dirigiert die Replikation des pET-Vektors, eines "low copy"-Plasmides, das streng genommen als Phagemid bezeichnet werden muss (vgl. auch Kapitel 2.4).

Lösungen:

Glycerin-Stammlösungen von Klonen: (Lagerung: -70°C)	Zusatz von 20 % (v/v) Glycerin (autoklaviert) zu einem Kulturaliquot
LB-Medium: pH 7,5 (autoklaviert)	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
LB-Platten:	1,5 % (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium (vor Autoklavieren)

Antibiotika-Zusätze: sterilfiltrierte Stammlösungen, die den Medien bzw. Agar-Lösungen nach Autoklavieren 1:1000 zugegeben werden:

Ampicillin-Stammlösung:	100 mg/ml	Endkonzentration: 100 µg/ml
Chloramphenicol-Stammlösung:	34 mg/ml	Endkonzentration: 34 µg/ml
Kanamycin-Stammlösung:	70 mg/ml	Endkonzentration: 70 µg/ml

2.2.4.1 Vorbereitung des pET-Vektors

Eine Präparation des wie oben beschrieben isolierten pET-Vektors wurde in Einzelschritten mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Bei der Klonierung von Fragmenten in die Nde I-Stelle des pET-Vektors stellt sich das Problem, dass dieses Enzym nicht in der Lage ist, die end- oder fast endständigen Sequenzen der PCR-Produkte effizient zu schneiden. Aus diesem Grund wurde in diesem Fall eine *blunt-end*-Ligation vorgenommen: Die Erkennungssequenz dieses Enzyms, die gleichzeitig das Initiations-Codon enthält, lautet CA/TATG, d.h. nach Restriktion des Vektors ergibt sich ein AT-Überhang. Dieser kann unter Verwendung einer modifizierten Polymerase aufgefüllt werden. Daher muss dieser Verdau zuerst durchgeführt werden. Die Ursprungssequenz wird durch das PCR-Produkt (TG am 5'-Ende des *upstream*-Primers) wieder ergänzt. Für die angesprochene Auffüllreaktionen wurde das sog. Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I verwendet, dem die für die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität verantwortliche Domäne fehlt. Entsprechend den Herstellerangaben (Fa. NEB: 2 units Klenow/µg DNA bei einer Endkonzentration von 1µg DNA/ml) wurden der

mit Nde I geschnittene und gereinigte Vektor, Enzym, ddATP und ddTTP und konzentrierte Pufferlösung zusammengegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die DNA wiederum über DNA-cleanup aus dem Reaktionsgemisch isoliert wurde. Nun erst wurde die zweite Restriktion mit BamH I durchgeführt. Im Anschluss an den zweiten Verdau musste die Vektor-DNA über ein präparatives Agarose-Gel gereinigt werden (s. Kap. 2.3.2), da das zu entfernende Fragment mit einer Größe von 70-80 Basenpaaren an die Reinigungsmatrices binden kann und dann die Ligation stört. Abschließend wurde der nun für die Aufnahme eines *inserts* vorbereitete Vektor gelelektrophoretisch quantifiziert.

2.2.5 Ligation

Der eigentliche Klonierungsvorgang, d.h. das Einbringen einer Fremd-DNA in einen Plasmidvektor geschieht in der Ligationsreaktion, wobei das Enzym Ligase die Bildung der Phosphodiesterbindung benachbarter 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden katalysiert. Diese Reaktion ist dann erleichtert, wenn sich zuvor überstehende Enden komplementärer Basen einer meist palindromischen Restriktionssequenz aneinander lagern können. In einem Standard-Ligationsansatz wurden ca. 20 ng Plasmid-DNA mit *insert* in leichtem molaren Überschuss in einem Reaktionsvolumen von 10 µl kombiniert:

- a) DNA wurde zu einem Volumen von 8 µl mit Wasser ergänzt.
- b) Zum initialen Schmelzen von unerwünschten Anlagerungen und Sekundärstrukturen wurde die Lösung 5 min auf 45°C erhitzt und direkt auf Eis gebracht.
- c) Je 1 µl zehnfach konzentrierter Puffer und Ligase wurden auf Eis zugegeben und die Reaktion für mehrere Stunden bis über Nacht bei 16°C im Thermoblock inkubiert.
- d) Unterschiedliche Volumina des Ansatzes wurden in entsprechende kompetente Wirtsstämme (JM109 im Falle des pET-Vektors) transformiert.

Im Falle der Klonierung in den pET-Vektor wurde wie oben beschrieben eine einseitige *blunt-end*-Ligation vorgenommen, die die Ligationseffizienz entscheidend herabsetzt. Aus diesem Grund wurde für diese Reaktionen eine hoch konzentrierte Ligase (5 u/µl) und ein größerer molarer Überschuss an *insert*-DNA verwendet.

2.2.6 Transformation

Zunächst müssen die entsprechenden *E.coli*-Wirtsstämme für die Aufnahme von Plasmid-DNA vorbereitet, d.h. kompetent gemacht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durchweg eine vereinfachte chemische Behandlung der Zellen mit Kalzium vorgenommen:

- a) Der jeweilige, in der Regel plasmidlose Stamm wurde auf LB-Platten durch Ausstrich und Übernacht-Inkubation bei 37°C vereinzelt; im Falle der BL-pLys-Stämme wurde zur Selektion auf das Lysozym-kodierende Plasmid Chloramphenicol als Selektionsmarker im Agar eingesetzt.
- b) Eine Einzelkolonie wurde in eine 100 ml LB (CAM)-Kultur im 250 ml-Kolben überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C und 200 rpm angezogen.

- c) Die Zellen wurden in eisgekühlten, autoklavierte Zentrifugenbechern bei 3000 x g im gekühlten Rotor pelletiert, alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis bzw. gekühlt
- d) Das Pellet wurde zweimal mit je 100 ml eiskalter, steriler Kalzium-Lösung gewaschen (Zentrifugation nach je 10-minütiger Inkubation auf Eis wie oben).
- e) Die Endaufnahme erfolgte in 2 ml eiskalter, steriler Kalzium-Glycerin-Lösung und Aliquots von 50 µl wurden bei -70°C gelagert.

Lösungen:

LB _(Cam) -Platten:	s. Kap. 2.3.4
Kalzium-Lösung:	100 mM CaCl ₂ (sterilfiltriert)
Kalzium-Glycerin-Lösung: (sterilfiltriert)	100 mM CaCl ₂ 20 % (v/v) Glycerin

Die eigentliche Transformation erfolgt entweder mit einer Plasmid-Preparation (ca. 20 ng DNA) oder Aliquots eines Ligationsansatzes:

- a) Kompetente Zellen wurden auf Eis getaut, möglichst konzentrierte DNA in maximal 5 µl vorsichtig untergemischt und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert.
- b) Die Zellen wurden für 45 sec bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und für 2 min zurück auf Eis transferiert.
- c) 500 µl LB wurden zugegeben, die Zellen für 45 min bei 37°C regeneriert.
- d) Unterschiedliche Volumina wurden auf LB_{Amp}-Platten (s. Kap. 2.3.4) ausgestrichen.

2.2.7 „Screening“

Typischerweise 10 Kolonien wurden auf Anwesenheit des korrekten *inserts* durch Restriktionsanalyse „gescreent“ (abgesucht). Die Plasmide wurden aus 5 ml einer Übernacht-Kultur (LB_{Amp}) über Promega-Miniprep isoliert. 100-200 ng DNA werden entweder sequenziell (Isolierung des linearisierten Plasmids nach dem ersten Verdau) oder in einem Doppelverdau mit den zur Klonierung benutzten Restriktionsenzymen verdaut, um die Wiederherstellung der Schnittstellen zu überprüfen, was insbesondere bei *blunt-end*-Ligationen einen kritischen Faktor darstellt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde gelelektrophoretisch analysiert. Bei der Klonierung der LMM-Fragmente in den pET-Vektor bietet sich zudem ein analytischer Verdau mit dem Enzym Hind III an, das ein 474 bp großes Fragment zwischen der "multiple cloning site" (Abfolge einer Reihe von Restriktionsstellen zur Einklonierung) des Vektors und der LMM-Sequenz freisetzt.

2.2.8 Expressionssysteme

Es wurden eine Reihe von Vektor-Systemen eingesetzt, um die gewünschten LMM-Fragmente in *E.coli* zur Expression zu bringen. Da im Rahmen dieser Arbeit strukturelle Untersuchungen im Vordergrund standen, wurde bei der Auswahl der Vektoren besonderer Wert gelegt auf deren Fähigkeit, die Moleküle möglichst in ihrer unveränderten Originalsequenz zu exprimieren. Die wenigsten kommerziell erwerblichen Plasmide bieten diese Mög-

lichkeit, da eines der vordringlichsten Ziele eines solchen Systems die effiziente und im breiten Spektrum einsetzbare Möglichkeit zur Reinigung der Proteine aus dem *E.coli*-Zelllysat ist. Vektorbedingte mehr oder weniger lange Sequenzanhängsel durch das unvermeidbare Initiations-Codon, Sequenzen aus der multiplen Klonierungs-Stelle und diverse sog. "tags" (Erkennungsanhänge), die vorwiegend der o.e. Affinitätsreinigung dienen, sind die Folge. Die exprimierten Hybride werden als Fusionsproteine bezeichnet.

Derartige Fremdsequenzen gilt es insbesondere bei der Arbeit mit Proteinen, deren Eigenschaften bei der Bildung supramolekularer Strukturen untersucht werden soll, weitestgehend zu vermeiden. Gewöhnlich wird dieses Problem durch die Einführung einer Erkennungssequenz für hochspezifische Endopeptidasen gelöst, die eine Abspaltung der Überhangsequenzen ermöglichen. Gängige Enzyme, die hierbei zum Einsatz kommen, sind Enterokinase, der Blutgerinnungsfaktor Xa oder Kollagenase. Auch bei diese Verfahren können zusätzliche Aminosäuren am Produkt verbleiben (Kollagenase). Ein Endprodukt gänzlich ohne zusätzliche Aminosäuren (s. Tab. 2-2) kann dann erhalten werden, wenn unter Verwendung einer Protease, die am C-terminalen Ende ihrer Erkennungssequenz spaltet (Enterokinase, Faktor Xa), die entsprechenden DNA-Kodierung in den *upstream*-Primer integriert wird. Dies wurde im Falle der Vektoren pMal (NEB) und pTrcHis (Invitrogen) versucht. Bei proteolytischer Aufarbeitung des Expressionsproduktes stellt sich jedoch das Problem interner Spaltstellen, da keine der verfügbaren "Restriktionsproteasen" eine ausschließliche Spezifität für eine Einzelsequenz aufweist (McDonald, 1985; Perona & Craik, 1995).

Gerade aufgrund dieses Faktors stellten sich die meisten der hier verwendeten Vektoren zur Expression von Fragmenten des LMM von Insekten-Myosin als unbrauchbar heraus, was eine Klonierung in unterschiedliche Systeme nötig machte. Es wurden folgende Plasmide zur Klonierung eingesetzt:

Tab. 2-2: Charakteristika verwendeter Expressionsvektoren

Vektor	Affinitäts-tag	Protease	Klonierungsstellen	Überhang-ASen
p340	β-Gal	Kollagenase	BamHI/Nco I	7
pMal	MBP	Xa / EK	XmnI/BamHI	2 / 0
pTrcHis	(His) ₆	EK / Xa	BamHI/KpnI	8 / 0
pET	(His) ₆	-	NdeI/BamHI	7

Alle vorgestellten Translationsprodukte wurden so konstruiert, dass sich die Überhangsequenzen am N-Terminus des Proteins befinden, während der C-Terminus unverändert bleibt. Auch diese Eigenschaft wurde speziell im Hinblick auf die hier zu exprimierenden Polypeptide gewählt, da u.a. eventuelle modifizierende Einflüsse C-terminaler Sequenzen untersucht werden sollten. Zudem ist bekannt, dass Domänen in diesem Bereich des LMM dessen Eigenschaften mit determinieren.

2.3 Mutagenese

Die hier angewendete Methode der Oligonukleotid-vermittelten Mutagenese erlaubt es, einen bestimmten Abschnitt einer Originalsequenz gezielt zu verändern, d.h. Additionen, Deletionen oder Substitutionen vorzunehmen. Dies wird erreicht durch Einbringen der gewünschten Sequenzänderung in ein Oligonukleotid, das man dann in eine biologisch aktive Plasmid-DNA umwandelt, indem es als Primer in einer *in vitro*-Synthese an einem ringförmigen DNA-Einzelstrang des Originals (ssDNA) fungiert.

Eine Möglichkeit, den nicht mutierten Originalstrang des doppelsträngigen Produkts der Synthese in den transformierten Bakterien zu diskriminieren, besteht darin, zuvor in den Einzelstrang größere Mengen Uracil einzubauen. Hierzu sind spezielle Stämme und Anzuchtbedingungen nötig, da Wildtyp-*E.coli* Uracil-haltige DNA effektiv degradiert. Dies führt nach der abschließenden Transformation des Synthese-Ansatzes zur weitgehenden Eliminierung der Originalsequenz (Kunkel *et al.*, 1987).

Die Herstellung von Einzelstrang-DNA (Vieira & Messing, 1987) der Originalsequenz ist an den Einsatz von Bakteriophagen gebunden. Daher muss das zu mutierende Fragment in einen Bakteriophagen-Vektor (z.B. M13) oder ein Phagemid (z.B. pUC119) umkloniert werden.

Eine typische Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese beinhaltet folgende Schritte:

1. Klonierung des DNA-Fragmentes in einen Bakteriophagen-Vektor oder ein Phagemid,
2. Synthese Uracil-haltiger DNA in einem Uracil-tolerierenden *E.coli*-Stamm,
3. Präparation von Einzelstrang-DNA mit Hilfe eines Helfer-Phagen,
4. *in-vitro*-Synthese des Doppelstrangs unter Verwendung von Mutations-Primern,
5. Transformation dieses Ansatzes in einen Uracil-diskriminierenden *E.coli*-Stamm,
6. *Screening* der Plamide nach der gewünschten Mutation; hierbei ist es von großem Vorteil, wenn die Möglichkeit besteht, in den mutagenen Primer eine sog. stille Mutation einzubauen, mit der man eine neue Restriktionsstelle kreiert oder solche verändert, ohne dass die resultierende Peptidsequenz betroffen ist.
7. Sequenzierung.

Die experimentellen Details der einzelnen hier durchgeführten Mutationen werden im Folgenden näher beschrieben:

2.3.1 Mutation von seltenen Arginin-Codons

In einem ersten Mutationsschritt wurde das zur PCR eingesetzte Original-*template* dahingehend mutiert, dass bestimmte Arginin-Codons, für die in *E.coli* vergleichsweise wenig tRNA's gebildet werden, durch "Hochfrequenz"-Codons ersetzt wurden. Dieser Schritt wurde nötig, nachdem festgestellt worden war, dass insbesondere ein Cluster von zwei in *E.coli* seltenen Arginin-Codons die hocheffiziente Überexpression mit dem pET-System unmöglich machte: Die unter Verwendung der Originalsequenz zur Expression gebrachten Proteine zeigten cha-

rakteristische Inhomogenität, es wurde eine Reihe von Fehlprodukten translatiert. Dabei ließen sich die in der Literatur beschriebenen Effekte einer Anhäufung von seltenen Codons an den Produkten nachvollziehen.

Es wurde daher versucht, dieses Cluster (Nukleotid-# 19599-19604 der Sequenz nach George *et al.*, 1989) sowie zwei seltene Codons am C-Terminus (Nukleotid-# 21141-43 und 21174-76) zu in *E.coli* häufig vorkommenden Sequenzen zu mutieren. Bei letzteren Mutationen handelt es sich eher um eine Vorsichtsmaßnahme, da die Codons sich nicht in unmittelbarer Nachbarschaft befinden. Jedoch wären eine Fehlexpression oder etwaige Schwierigkeiten sehr schwer nachzuvollziehen, da die Fehlprodukte im SDS-Gel kaum voneinander zu unterscheiden wären. Zudem erleichtert die Anwesenheit eines zweiten Primers die *in vitro* Translation derart, dass z.T. die Addition von zusätzlichen Oligonukleotiden empfohlen wird.

Tab. 2-3: Mutation seltener Codons (kursiv: seltene Arginin-Codons; unterstrichen: mutierende Basen; fett: zum Restriktions-Screening verwendete Endsequenzen)

A: Mutation der AGG-Doublette in Exon 17; Screening-Enzym: Nae I; Zielsequenz: GCCGGC
(Primer: 2Argmut)

Original-Sequenz:	5'	GGATGGTGAGCAG	AGGAGG	CACGCCGATGCCC	3'
Primer:	3'	CCTACCACTCGTC	<u>GCGGCC</u>	GTGCCCGTACGGG	5'
End-Sequenz:	5'	GGATGGTGAGCAG	CGCCGG	CACGCCGATGCCC	3'

B: Mutation seltener Kodons in Exon 19; Screening-Enzym: Eae I; Zielsequenz: Py GGCC Pu
(Py: Pyrimidin-Base, Pu: Purin-Base; Primer: "19Argmut")

Orig.Sequenz:	5'	TCCGTT	AGG	CCACAATTCGACGGATTGGCCTTCCCACCA	AGA	TTCGAC	3'
Primer:	3'	AGGCAA	<u>GCC</u>	GGTGTAAAGCTGCCTAACCGGAAGGGTGGT	<u>GCT</u>	AAGCTG	5'
Endsequenz:	5'	TCCGTT	CGG	CCACAATTCGACGGATTGGCCTTCCCACCA	CGA	TTCGAC	3'

2.3.1.1 Umklonierung

Ein 2 kB (1970 bp) Bgl II / Eco RI-Fragment aus dem Klon CD 305 (Dr. R. Brundage, Univ. of Pennsylvania), das die gesamte für die hier untersuchten LMM Fragmente kodierende Region einschließlich des Exon 19 enthält, wurde in das Phagemid pUC 119 umkloniert. Ein *screening* positiver Kolonien ist hier über die sog. α -Komplementierung möglich: pUC-Vektoren kodieren für ein Fragment von β -Galaktosidase, das eine defekte Form des Enzyms im ansonsten defizienten Wirtstamm (lokalisiert auf dem F'-Episom) ergänzt. Das Einbringen eines *inserts* zerstört das offene Leseraster für das Fragment, so dass positive Kolonien keine Enzymaktivität aufweisen (kein Umsatz des Substrats X-Gal) auf entsprechend präparierten Platten führt zu farblosen Kolonien). Die Umklonierung wurde wie folgt vorgenommen:

- jeweils 10facher Überverdau einer CD 305-Plasmidpräparation aus 10 ml Übernacht-Kultur mit Bgl II und Eco RI; Einzelverdau mit zwischengeschalteter DNA-Reinigung;
- Gewinnung des 2 kB-Fragments durch präparative Gelelektrophorese;

- c) jeweils 10facher Überverdau von 3 µg pUC 119 mit BamHI und EcoR I im Einzelverdau mit zwischengeschalteter Isolierung der linearisierten DNA; die kohäsiven Enden eines BamH I-Verdau sind mit denen von Bgl II kompatibel;
- d) präparatives Gel zur Extraktion des modifizierten linearen Phagemids;
- e) Quantifizierung der beiden Komponenten mittels Gelelektrophorese;
- f) Ligationsansatz mit *insert*-Plasmid-Verhältnissen von 2:1 und 7:1; 2 h bei 16°C (s. Kap. 2.3.5);
- g) Transformation unterschiedlicher Mengen dieser Ligation in kompetente JM109-Zellen, die zur α-Komplementierung fähig sind;
- h) Plattieren eines Aliquots des Transformationsansatzes auf LB_{Amp, X-Gal, IPTG}-Platten;
- i) Restriktionsanalyse einiger positiver (= nicht-blauer; keine α-Komplementierung) Kolonien mit Eco RI (Einzelschnitt), Hind III (Doppelschnitt: außerhalb und innerhalb des *inserts*), Aat II (wie Hind III). Positive Klone werden als pUCLMM#n bezeichnet.

Lösungen:

LB _{Amp, X-Gal, IPTG} -Platten:	40 µl X-Gal-Stammlösung und 4 µl IPTG-Stammlösung gespreitet auf LB _{Amp} -Platten (s. Kap.: 2.3.4)
X-Gal-Stammlösung:	20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid
IPTG-Stammlösung:	200 mg/ml IPTG (sterilfiltriert)

2.3.1.2 Gewinnung Uracil-haltiger DNA

- a) Der Kunkel-Stamm RZ 1032 wurde unter selektiven Bedingungen zum *Screening* auf das F'-Episom auf M9-Platten vereinzelt und wie in Kap. 2.3.6 beschrieben in LB-Medium angezogen und kompetent gemacht.
- b) Transformation des Vectors pUCLMM#1 in RZ-Zellen, plattieren auf LB_{Amp, Uridin}-Platten;
- c) Anzucht einer 5ml Übernachtskultur in LB_{Amp, Uridin}, Plasmidpräparation;
- d) Kontrolle des Uracil-Gehaltes der präparierten Plasmide durch Transformation in a) den Kunkel-Stamm RZ 1032 und b) den Wild-Typ-Stamm JM 109 und Plattieren auf LB_{Amp}-Platten; die Kompetenz der jeweiligen Charge wurde durch Transformation eines Vergleichsplasmids normiert.
- e) Wiederholung des Schrittes b) mit dem nun schon Uracil-haltigen Plasmid.

Lösungen:

M9-Salzkonzentrat (5fach): (autoklaviert)	239 mM Na ₂ HPO ₄ 110 mM KH ₂ PO ₄ 4,3 mM NaCl 9,4 mM NH ₄ Cl
M9-Platten:	1,5 % (w/v) Agarose (autoklaviert) mit 1fach M9-Salzen 0,4 % (w/v) Glucose
Glucose-Stammlösung:	20 % (w/v) Glucose (sterilfiltriert)
Uridin-Stammlösung:	0,25 mg/ml Uridin (sterilfiltriert): Einsatz 1:1000 in LB-Medium oder –Platten (nach Autoklavieren)

2.3.1.3 Präparation von ssDNA (nach Sambrook *et al.*, 1989)

- a) 2-3 ml 2xYT_{Uridin}-Medium wurden mit einer der wie oben beschrieben frisch angezogenen, Uracil-Phagemid enthaltenden RZ-Kolonien angeimpft (mehrere Parallelansätze). Ein Aliquot der Kolonie wurde auf M9-Platten ausgestrichen, um sie auf die Anwesenheit des F-Episoms zu testen.

- b) Der mit einem Kanamycin-Resistenzgen ausgestattete Helferphage VCS M13 wird zu einer Endkonzentration von $2,5 \cdot 10^7$ pfu/ml zugegeben.
- c) Unter kräftigem Schütteln (300 rpm/min) wurde die Kultur 1,5 h bei 37°C inkubiert.
- d) Die Kultur wurde nun mit Kanamycin zu einer Endkonzentration von 70 µg/ml versetzt, um nicht infizierte Bakterien abzutöten, und über Nacht weiter geschüttelt.
- e) Die Ansätze, deren Ausstrich auf M9-Platten positiv waren, wurden zur Isolierung der ss-DNA behandelt:
- f) 1,5 ml der Kultur wurden 5 min bei 12000 g zentrifugiert,
- g) 1,2 ml des Überstandes wurden mit 200 µl PEG/NaCl- Lsg. versetzt, 25 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 5 min bei 12000 g abzentrifugiert.
- h) Der Überstand wurde möglichst quantitativ entfernt und
- i) das Pellet in 100 µl TE resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- j) Es wurde zur Extraktion der Proteinkomponenten 50 µl Phenol zugegeben und mehrmals a) für 30 sec gevortext und b) 1 min ruhen gelassen.
- k) Die Emulsion wurde 1 min bei 12000 x g zentrifugiert und
- l) aus 90 µl der wässrigen Phase wurde durch Ethanol-Fällung (Sambrook *et al.*, 1989) die Einzelstrang-DNA präzipitiert; Endaufnahme in 25 µl TE.
- m) 2 µl der Präparation wurden in SDS-Auftragspuffer auf einem 1 %-Agarose-Gel analysiert und die Konzentration durch Vergleich mit dem λ-Marker näherungsweise abgeschätzt.

Lösungen:

2xYT _{Uridin} -Medium: pH 7,0	16g/l Bacto-Trypton 10 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl 0,25 µg/ml Uridin
PEG/NaCl-Lösung:	20 % (w/v) Polyethylenglycol (8000) 2,5 M NaCl
Phenol:	Tris-gepuffert pH 8,0
TE-Puffer: pH 8,0	10 mM Tris 0,5 mM EDTA
6fach SDS-Auftragspuffer:	30 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 6 % (w/v) SDS

2.3.1.4 *in vitro*-Synthese des Komplementärstranges

Die Polymerase/Ligase-Reaktion zur Synthese des mutierten Komplementärstranges benötigt folgende Komponenten: 1. ss-DNA-*template*, 2. einen oder mehrere mutagene Primer, die zuvor am 5'-Ende durch eine Polynukleotid-Kinase phosphoryliert wurden, 3. eine zuverlässige Polymerase mit *proofreading*-Aktivität, die keine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität aufweist, 4. Ligase, 5. ATP, 6. dNTP's und 7. Puffer.

A) Phosphorylierung der mutagenen Primer

Die Primer werden zunächst ohne weitere Vorbehandlung wie vom Hersteller geliefert (Qualität: salzfrei) nach entsprechender Verdünnung mit T4 Polynukleotid-Kinase phosphoryliert.

Da die beiden mutagenen Primer (2Argmut, 19Argmut) in einem Kombinationsansatz verwendet werden sollten, wurde bereits die Phosphorylierung in einer Reaktion durchgeführt:

Primer 2Argmut [20 µM]	8 µl	(= 160 pmol)
Primer 19Argmut [20 µM]	8 µl	(= 160 pmol)
ATP [10 mM, pH 7,5]	2 µl	
Kinase-Puffer (10fach)	2 µl	
T4-Polynukleotidkinase	0,5 µl	(= 5 U)

Die Reaktion wurde 1 h bei 37°C inkubiert und durch 10-minütiges Aufheizen auf 70°C und damit verbundener Denaturierung der Proteine gestoppt. Der Ansatz wurde ohne weitere Aufarbeitung in der unten beschriebenen Mutationsreaktion eingesetzt.

B) *Annealing* der Primer an das ssDNA-*template*

In Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook *et al.*, 1989) werden verwendet: 1 µg ssDNA-*template* (entspricht ca. 0,5 pmol des hier zu mutierenden Einzelstrangs von 5200 Basen) und ein Primer:*template*-Verhältnis von 20:1. Die Schmelztemperatur der hier eingesetzten mutagenen Primer beträgt laut Analyse durch die OLIGO-Software mehr als 100°C, was vor allem durch deren Länge bedingt ist. Jedoch wurde diese Analyse zum Anlass genommen, die empfohlene Initialtemperatur zum Schmelzen von 70°C auf 97°C anzuheben. Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

ss pUCLMM#1	3 µl	(ca. 1µg; 0,5 pmol)
phosphorylierte Primer (s.o.)	1,3 µl	(jew. 10 pmol)
20fach SSC	0,5 µl	
H ₂ O	15,2 µl	

Lösung:

20fach SSC:	175,3 g/l NaCl
pH 7,0; autoklaviert	88,2 g/l Natriumcitrat

In einem vorgeheizten Heizblock wurde das Gemisch 8 min lang auf 97°C erhitzt, bevor der Block langsam bei Raumtemperatur abgekühlt wurde. Über einen Zeitraum von ca. 90 min kühlten die Ansätze auf etwa 30°C ab und wurden auf Eis gebracht. Nach kurzem Anschleudern in der Tischzentrifuge wurden nun in dieser Reihenfolge zupipettiert:

H ₂ O	43 µl
ATP [10 mM, pH 7,5]	10 µl
dNTP's [jew. 5 mM]	10 µl
T4 Polymerase-Puffer	10 µl
BSA [1 mg/ml]	5 µl
Ligase	2 µl (= 10 U)
T4 Polymerase	1 µl (= 3 U)

Der Ansatz wurde nach zügiger Durchmischung 5 min weiter auf Eis gehalten, dann für 25 min nach Raumtemperatur transferiert und schließlich 1 h bei 37°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von EDTA (0,5 M; pH 8,0)-Lösung zu einer Endkonzentration von 15 mM terminiert wurde. Eine Erhöhung der Inkubationsdauer resultierte in einer unterproportionalen Zunahme der Anzahl der aus der abschließenden Transformation hervorgehenden Kolonien (Verdopplung der Reaktionszeit: Faktor 1,3-1,4). Unterschiedliche Mengen der Synthese-Reaktion werden in JM109-Zellen transformiert.

2.3.1.5 Screening

Plasmid-Präparationen der resultierenden Klone wurden mit Hilfe der neu entstandenen Restriktionsstellen für Nae I (2Argmut) und Eae I (19Argmut) auf die Anwesenheit der Mutationen gescreent: Korrektes *priming* des 2Argmut-Oligonukleotids führt dabei zu einer 757 bp-Bande (pUC selbst besitzt eine Erkennungsstelle für dieses Enzym). Ein 130 bp-Fragment des pUCLMM-Vektors (mit multiplen Stellen für Eae I) wird bei erfolgtem Einbau der durch 19Argmut kodierten Sequenz in zwei 52 bzw. 78 bp große Bruchstücke gespalten. Als Negativ-Kontrolle diente jeweils das Plasmid pUCLMM#1.

Weitere analytische Restriktionen mit Hind III, Aat II und EcoR I sicherten die Integrität des nun mutierten *templates*. Ein nach allen Verdaus positiver Klon wurde als pUC LMM 4A #12 bezeichnet.

2.3.1.6 Sequenzieren

Das in der Folge als *template* für die PCR Amplifikationen verwendete Plasmid wird wie im Kapitel 2.5 beschrieben sequenziert.

2.3.2 Serin-Glutamat-Austausch im durch Exon 19 kodierten Abschnitt

Um eine etwaige Funktion des nach Sequenzvergleich als potentiell PKC-Substrat einzustufenden Ser 2389-Restes (SWISS-PROT: P05661) als Phosphorylierungsstelle im Exon 19-kodierten C-terminalen Abschnitt untersuchen zu können, wurde ein Serin-Glutamat-Austausch vorgenommen. Dafür standen zwei mögliche Strategien zur Auswahl: a) das schon in das Phagemid umklonierte und mutierte Fragment weiter als Matrize für die *in vitro*-Mutation zu verwenden und den resultierenden Vektor für eine erneute PCR einzusetzen oder b) die Eigenschaft des pET-Vektors als Phagemid (f1-origin) zu nutzen und die schon klonierten Fragmente im Expressionsvektor direkt zu mutieren. Zwar waren die Bedingungen für die erste Alternative schon ausgetestet und optimiert, jedoch hätte diese Vorgehensweise eine zusätzliche PCR-Reaktion involviert, was als Fehlerquelle ausgeschlossen werden musste.

Es wurden also die pET-Klone 319 #2 und 219 # 3 direkt mutiert (unterstrichen: mutierende Basen; fett: zum Restriktions-*Screening* verwendete Sequenz; Primer: 19GluA):

Original-Sequenz:	5'	CCCCGTGCG ACG	TCC	GTTAGGCCACAA	3'
Primer (19GluA):	3'	GGGGCACGCTGC	<u>CTC</u>	CAATCCGGTGTT	5'
End-Sequenz:	5'	CCCCGTGCGACG	GAG	GTTAGGCCACAA	3'

Eine in der nicht mutierten Originalsequenz vorhandene Schnittstelle für das Enzym Aat II: GAC/GTC wird durch diesen Primer zerstört, was man sich in der Folge für das *screening* der Klone zu Nutze machen kann.

Prinzipiell wurde in diesen Ansätzen wie für die Arginin-Mutationen beschrieben vorgegangen. Bedingt durch die Natur des Replikationsursprungs des pET-Vektors bzw. der *inserts* ist die Ausbeute an Einzelstrang-DNS in diesem Fall geringer. Um ssDNA-*template* in ausreichender Menge zu erhalten, wurde im Falle von pET 219 #3 die doppelte Menge einer bis dahin wie in Kap. 2.4.1.3 angezogenen Minikultur aufgearbeitet.

Um das Risiko eines Fehl-*primings*, das aufgrund der hier angewendeten *Screening*-Strategie nicht direkt durch Restriktionsanalyse detektierbar wäre, möglichst gering zu halten, wurde für diese Reaktionen ein Primer:*template*-Verhältnis von 3:1 gewählt. Alle übrigen Bedingungen entsprechen den im Kapitel Arginin-Mutationen ausgeführten.

2.4 Sequenzierung

Klone, die durch Restriktionsanalyse als positiv für das entsprechende *insert* korrekter Größe identifiziert worden waren, wurden über die Thermocycler-Variante der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert. Das hier verwendete Verfahren, das mit dem Circum-VentTM-Kit der Firma NEB durchgeführt wurde, bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber der klassischen Sequenzierung bei Raumtemperatur. Separate Schritte zur Denaturierung doppelsträngiger DNA und zum Primer-*annealing* werden eliminiert und störende DNA-Sekundärstrukturen spielen keine Rolle mehr, da wie in der PCR bei hohen Temperaturen mit hitzestabilen Polymerasen gearbeitet werden kann. Darüber hinaus bietet es naturgemäß die Möglichkeit, bei geringer Menge an *template*-DNA eine große Anzahl von Reaktionen simultan durchzuführen.

In Vorbereitung auf die eigentlichen Sequenzier-Reaktionen wurden die einzelnen Primer in separaten PCR-Reaktionen mit einem als sehr spezifisch bekannten Partner auf ihre Rate an Fehl-*priming* getestet. Dies ist insbesondere bei den potentiell repetitiven Sequenzen des LMM-Codes angezeigt, da vor der sehr aufwendigen und hier mit der Verwendung von Radioaktivität verbundenen Sequenzierung die jeweilige Spezifität über die Software-Analyse hinaus visualisiert und optimiert werden kann.

2.4.1 Thermocycler-Reaktion

Die radioaktive Markierung der Produkte erfolgte während der Reaktion durch die Inkorporation von α -³⁵S-dATP in die synthetisierten Einzelstränge. Die unten beschriebenen Bedingungen für die Cycler-Parameter wurden in Bezug auf die Anzahl der Zyklen und die *annealing*-Temperatur anhand des Primers sp2, der die größte Rate an unspezifischem *priming* aufwies, optimiert und in der Folge für sämtliche Reaktionen verwendet. Dieser Primer wurde im Gegensatz zu den übrigen in einer Endkonzentration von 0,15 pmol/ddNTP-Ansatz eingesetzt (s.Tab.2-4). Ansonsten wurden die vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen an *template* und Primer umgesetzt.

Tab. 2-4: Sequenzier-Primer

Primer	Orientierung	Sequenz 5'-3'	pmol/Ansatz
T7	sense	CACAACGGTTTCCCTCT	0,3
sp1	sense	CAGAAGGCCTTCGACAA	0,3
2N	sense	GCTGCCCTCGAGGAGGC	0,3
sp2	sense	GCTAACGCCGAGGCCCA	0,15
1N	sense	CTGCACTCCGACCTGGA	0,3
T7 A	antisense	TATTGCTCAGCGGTGGC	0,3

Um größtmögliche Reinheit des zur Sequenzierung verwendeten *templates* zu erzielen wurde dieses in zwei Schritten präpariert. Dies ist insbesondere im Fall der pET-Vektoren angeraten, da diese sog. "low copy"-Plasmide darstellen, d.h. bei Aufarbeitung ähnlicher Mengen an Ausgangskultur ist die Ausbeute vergleichsweise gering, bzw. bei Präparation aus größeren Mengen Ausgangsmaterial sind die Verunreinigungen größer. Das *template* wurde somit aus einer 70 ml-Kultur (JM109) über Promega-Midiprep in einem Endvolumen von 300 μ l H₂O präpariert, mit 30 μ l eines beliebigen 10x-Enzympuffers versetzt und abschließend noch einmal über DNA-cleanup (Promega) zusätzlich gereinigt und auf ein End-Elutionsvolumen von 50 μ l konzentriert. Die Konzentration wurde gelelektrophoretisch anhand des Hind III-Fragmentes zwischen bp 19550 der Sequenz nach George *et al.* (1989) und der *multiple cloning site* des jeweiligen Vektors im Vergleich zu λ -DNA bestimmt.

Doppelsträngiges *template* wurde gemäß Kit-Handbuch in einer Endkonzentration von ca. 0,025 pmol je Nukleotid-Mix eingesetzt, beispielsweise im Fall der pET-Vektoren mit einer durchschnittlichen Größe von 4 kB zu 60 ng/ddNTP-Reaktion.

Die Reaktionen wurden essentiell entsprechend der Firmen-Instruktionen in individuellen Ansätzen von 6,2 μ l pipettiert und die Cycler-Reaktion mit folgenden Parametern durchgeführt: 25 Zyklen á: 1 min 95°C, 1 min 66°C, 1 min 72°C; Endkühlung bei 4°C.

Die Reaktionen wurden mit 4 μ l Stopplösung versetzt und bis zum Lauf bei -20°C aufbewahrt.

2.4.2 Sequenzier-Gele

Die 0,4 mm dicken, 35 x 43 cm- Sequenziergele wurden auf einer BRL- Anlage mit zugehörigem Equipment gefahren. Als Besonderheit sei die Verwendung der Antihafbeschichtung GelSlick® (Fa. BMA), einer ungiftigen Alternative zur herkömmlichen Silanisierung, auf der sorgfältig mit Ethanol und Aceton gereinigten Frontglasplatte erwähnt. Die Polacrylamid-Gele wurden unter Verwendung der LongRanger®-Gellösung (50 % Acrylamid) hergestellt, die es nach Angaben des Herstellers (Fa. BMA) durch ein modifiziertes Acrylamid-Monomer und einen neuartigen Quervernetzer (optimierte Retention) erlaubt, bis zu 30 % mehr Sequenzinformationen bei gleichen Laufbedingungen zu erhalten. Die über 0,45 µm-Membran gefilterte Gel-Stammlösung wurde so angesetzt, dass sich durch Mischen von 70,4 ml mit 9,6 ml LongRanger®-Lösung folgende Endkonzentrationen ergaben:

6 % Acrylamid; 8 M Harnstoff; 1fach TBE.

Der Polymerisation wurde nach Zugabe von 40 µl TEMED und 400 µl APS-Lösung mindestens 2 Stunden Zeit gegeben. Die Gele wurden einem 30-minütigen Vorlauf bei 60 Watt unterzogen, um die Lauftemperatur einzustellen. Dabei wurde im unteren Laufpuffer 1 M Natriumacetat als Additiv verwendet (Swerdlow *et al.*, 1994), um einen Temperaturgradienten über dem Gel zu erzeugen, der durch einen kälteren unteren Gelabschnitt die Wanderung der Fragmente zunehmend verlangsamt, so dass engere Bandenabstände und damit mehr lesbare Basen resultieren. Die Temperatur wurde im oberen Gelbereich über ein Flüssigkristall-Thermometer kontrolliert und soll 50°C nicht übersteigen.

Die Proben wurden über einen 60-Zähne-Kamm aufgetragen, der es erlaubt, die gesamte Sequenz auch der größeren Fragmente auf einem Gel zu überprüfen. Dazu müssen die einzelnen Reaktionen zeitlich versetzt doppelt aufgetragen werden, um den 300 bp-Abstand zwischen den Sequenzier-Primern vollständig ablesen zu können.

3 µl der vier Elongations-Reaktionen jedes Primers wurden nach Erhitzen auf 80°C für zwei Minuten in der Reihenfolge GATC (entsprechendes ddNTP im Ansatz) geladen und der Lauf zunächst bei 60 Watt für 2,5 Stunden gestartet. Vor dem zweiten Auftrag der nicht wieder erhitzten Proben wurde der untere Puffer ausgetauscht und der Lauf für exakt 2 h fortgesetzt. Die Laufzeit des zweiten Auftrags ist kritisch, um den kodierenden Bereich des N- und C-Terminus zu erfassen. Nach Entfernen der vorderen Glasplatte wurde das Gel für 15 min in Fixierlösung gebadet, um dann vorsichtig mit angefeuchtetem Whatman 3MM- Papier von der hinteren Glasplatte gelöst zu werden. Es wurde, überzogen mit Zellophan-Folie, 2 h bei 80°C im Geltrockner getrocknet und je nach Alter der Radioaktivität zwischen zwei und vier Tagen bei -70°C (ohne Folie) autoradiographiert.

Lösungen:

Gelstammlösung:	114 ml/l 10fach TBE 545 g/l Harnstoff
Acrylamid-Lösung:	LongRanger® (50 % w/v)
APS-Lösung:	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
oberer Laufpuffer:	1fach TBE
unterer Laufpuffer:	1 fach TBE + 1 M Natriumacetat
Fixierlösung:	10 % (v/v) Essigsäure 15 % (v/v) Methanol

2.5 Expression

Nachdem eine Reihe von Vektoren und Expressions- bzw. Isolierungsmethoden auf ihre Tauglichkeit zur Herstellung von Insekten-LMM Fragmenten überprüft worden waren, stellte sich schließlich das pET-System (Studier & Moffatt, 1986) als optimales Verfahren heraus. Da keine Endoprotease gefunden werden konnte, die zuverlässig nur die gewünschte Erkennungssequenz in Fusionsproteinen mit LMM-Fragmenten schneidet, stellt diese Wahl einen Kompromiss dar, der bei geringer Anzahl von endständigen Überhang-Aminosäuren eine einheitliche Affinitätsreinigung aller Fragmente erlaubt. Der pET-Vektor gilt als eines der effizientesten Systeme, die derzeit verwendet werden. Dies beruht auf der außergewöhnlichen Selektivität und Aktivität der T7-Polymerase in Verbindung mit dem entsprechenden Promotor, über die die Transkription gesteuert wird. Ein zusätzlicher Vorteil ist die Möglichkeit, alle Klonierungs- und Modifikationsschritte in Abwesenheit einer entsprechenden Polymerase durchzuführen. Dadurch wird optimale Plasmidstabilität garantiert, da keine Hintergrund-Expression stattfindet, die oft zu einem Selektionsdruck in Richtung Modifikation oder Eliminierung des Plasmids führt.

Die Wirtstämme zur eigentlichen Expression sind Lysogene des Bakteriophagen DE3 (λ -Derivat), der das T7-Polymerase-Gen unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors bzw. des *lac*-Repressors trägt und in das Bakteriengenom integriert ist. Die Transkription der Polymerase kann damit über Zugabe von IPTG induziert werden, die wiederum die Zielsequenz transkribiert. Der am weitesten verbreitete Expressionsstamm ist das DE3-Lysogen des Stammes BL21. Dieser zeichnet sich unter anderem durch das Fehlen zweier Proteasen der äußeren Membran aus, die ein potentielles Abbaurisiko während der Reinigung des Zielproteins darstellen. Alternativ zu den DE3-Stämmen kann in Fällen, in denen die Hintergrundexpression von T7-Polymerase die Plasmidstabilität stark gefährdet ist, das Enzym in Nicht-Lysogene (BL21) über Bakteriophagen-DNA (λ -CE6) eingeschleust werden. So können auch sehr "toxische" Genprodukte, d.h. solche, die stark mit der Bakterienphysiologie interferieren, zur Expression gebracht werden. Eine weitere Möglichkeit, variabel auf die produktspezifische Reaktion der Zellen auf das Fremdprotein zu reagieren, bietet die Verwendung von Stämmen mit Zweitplasmiden, die in Abhängigkeit vom dazugehörigen Promotor unterschiedliche

Mengen an T7-Lysozym zur Verfügung stellen. Dieses Enzym ist ein natürlicher Inhibitor der T7-Polymerase und kann die innere Zellmembran nicht passieren, so dass keine Lyse auftritt. Es wird über den Vektor pLysS in geringen Mengen und über pLysE in substantiell größeren Mengen synthetisiert. Um größtmögliche Sicherheit für die Plasmidstabilität zu erreichen, wurde der Großteil der hier verwendeten Plasmide im Stamm BLR(DE3)pLysS exprimiert, wobei das R das Fehlen eines *E.coli*-Proteins, das in Rekombinationsprozesse involviert ist, anzeigt. Der Stamm BL(DE3)pLysE wurde in Fällen eingesetzt, in denen eine stark reduzierte Expression in den vorgenannten Zellen zu verzeichnen war, namentlich für die Fragmente 3-1, 2-18 und 2-1. Hier war zu befürchten, dass die offensichtlich höhere "Toxizität" den Verlust oder die Beschädigung der Plasmide verursachen könnte. Aus diesem Grund wurde das gehemmte Wachstum und geringfügig niedrigere Produktausbeuten in diesen Zellen in Kauf genommen. Die pLys-Plasmide tragen eine Chloramphenicol-Resistenz, die zur Selektion genutzt wurde.

2.5.1 Anzucht

Vor jedem Expressions-Experiment wurden kompetente Zellen der oben erwähnten Stämme frisch mit den jeweiligen Plasmiden transformiert und 24 h bei 37°C auf LB_{Amp,Cam}-Platten vorgezogen. Einzelne Kolonien wurden in einer 5 ml Übernacht-Kultur (LB_{Amp,Cam}, sterile Reagenzgläser) im Tischinkubator bei 37°C und 200 rpm angezogen. 500 µl dieser Kultur wurden zur Animpfung der 100 ml-Hauptkultur (250 ml-Kolben) unter gleichen Bedingungen verwendet. Die Kulturen wurden bis zu einer Extinktion der Zellsuspension von 0,8 bei 600 nm gezogen und die Expression mit 1 mM IPTG für 3 h induziert.

Lösungen:

LB _{Amp,Cam} -Medium:	10 g/l Bacto-Trypton
pH 7,5	5 g/l Hefeextrakt
(autoklaviert)	10 g/l NaCl
unmittelbar vor Kultur:	34 mg/l Chloramphenicol
	100 mg/l Ampicillin
LB _{Amp,Cam} -Platten:	1,5 % (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium (Antibiotikum wie oben nach Autoklavierung)

2.5.2 Zellaufschluss

In Anlehnung an Atkinson *et al.* (1991) wurde der Zellaufschluss in einer Kombination aus Frier-Tau-Zyklen und Ultraschall durchgeführt. Die Zellen wurde 10 min bei 3 000 x g pelletiert und zweimalig mit je 200 ml Waschpuffer resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Das Pellet wurde in drei Zyklen in flüssigem Stickstoff für ca. 30 sec schockgefroren und bei Raumtemperatur je nach Zyklus zwischen 10 und 20 min getaut, wobei darauf geachtet wur-

de, dass keine Erwärmung über 0°C erfolgte. Das resultierende Zellpellet wurde in 9 ml Lysepuffer 1 resuspendiert und Lysozym zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml (Stammlösung 10 mg/ml in Lysepuffer 1) zugesetzt. Der Lyse wurde 30 min auf Eis Zeit gegeben, bevor 10 ml Lysepuffer 2 zugemischt wurden.

Die Präparation wurde in ein 35 ml-Plastikröhrchen überführt, und sechsmal für je 20 sec unter zwischenzeitlicher Kühlung auf Eis mit der "microtip"-Sonde am entsprechenden Intensitätslimit beschallt. Durch abschließende Ultrazentrifugation wurde das Lysat für 1 h bei 200 000 x g geklärt.

Lösungen:

Waschpuffer:	100 mM KCl
pH 8,0	10 mM Tris
	1 mM EDTA
	0,02 % (w/v) NaN ₃
Lysepuffer 1:	25 % (w/v) Saccharose
pH 8,0	50 mM Tris
	Protease-Inhibitoren
Lysepuffer 2 :	Lysepuffer 1 + 2 M KCl
Protease-Inhibitoren:	1:1000 der Stammlösungen:
PMSF	100 mM in Ethanol
TPCK	10 mg/ml in Ethanol
Leupeptin	1 mg/ml in Ethanol
Pepstatin	1 mM in Methanol

2.5.3 Affinitätschromatographie

Als Affinitätsmatrices zur Aufreinigung von Histidin-*tag*-Proteinen kamen Ni-NTA Agarose der Firma Qiagen bzw. ProBond™-Matrix der Firma Invitrogen zum Einsatz. Die Säulen mit einem Gelbettvolumen von 5 ml wurden nach Herstellerangaben vorbereitet bzw. regeneriert, falls vorher schon in Gebrauch gewesen. Bei wiederholtem Gebrauch wurde eine bestimmte Säule nur für das entsprechende Fragment wiederverwendet, um Kontaminationen auszuschließen. Die Säulenläufe wurden im Kühlraum unter Verwendung einer Peristaltikpumpe und eines Fraktionssammlers durchgeführt.

Zur abschließenden Vorbereitung wurden die Säulen mit mindestens 100 ml Säulenpuffer A äquilibriert. Nach dem Probenauftrag bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurde über Nacht bei 0,2 ml/min gewaschen. Es schlossen sich zwei Waschschritte zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine mit den Säulenpuffern B und C an, bei denen jeweils bei 0,7 ml/min für 2 h gespült wurde. Die gebundenen Fragmente wurden mit Säulenpuffer D von der Matrix eluiert, der über Komplexierung des Nickel-Ions durch EDTA die Protein-Matrix-Bindung löst. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurden 3 ml-Fractionen gesammelt, die in diesem Fall weder "online" über eine Durchflusszelle noch im Anschluss eindeutig photometrisch über die UV-Extinktion bei 280 nm quantifiziert werden können, da

der bläuliche Nickel-Komplex interferiert und im Gegensatz zum ebenfalls absorbierenden Imidazol nicht korrigiert werden kann. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde also über den Bradford-Test (s. Kap. 2.20) bestimmt und Fraktionen mit Konzentrationen größer 0,3 mg/ml vereinigt. In Einzelfällen, in denen diese Mindestkonzentration präparationsbedingt nicht erzielt werden konnte, wurden die vereinigten Fraktionen vor der abschließenden Dialyse über centriplus® entsprechend eingengt.

So präparierte Proteine wurden extensiv, d.h. zweimalig gegen ein hundertfaches Volumen Aufbewahrungspuffer dialysiert, die Proteinkonzentration über den Bradford-Test bestimmt und die mit Protease-Inhibitoren (s. Kap. 2.6.2) versetzten Proteinlösungen auf Eis im Kühlschrank aufbewahrt.

Lösungen:

Säulenpuffer A: pH 8,0	1 M KCl 20 mM KH ₂ PO ₄ 0,02 % (w/v) NaN ₃
Säulenpuffer B: pH 6,0	1 M KCl 20 mM KH ₂ PO ₄ 0,02 % (w/v) NaN ₃
Säulenpuffer C: pH 6,5	0,5 M KCl 20 mM KH ₂ PO ₄ 80 mM Imidazol 0,02 % (w/v) NaN ₃
Säulenpuffer D: pH 6,5	0,5 M KCl 20 mM KH ₂ PO ₄ 80 mM Imidazol 25 mM EDTA 0,02 % (w/v) NaN ₃
Aufbewahrungspuffer: pH 7,2	0,6 M KCl 10 mM Imidazol 0,02 % (w/v) NaN ₃

2.6 Dünnschnitte von induzierten Bakterien

Die teilweise extrem hohen Ausbeuten an Zielprotein kombiniert mit der Tatsache, dass offensichtlich die Proteine nicht in membranumhüllten Einschlusskörpern („inclusion bodies“) vorlagen, legten a priori den Schluss nahe, dass die Moleküle erwartungsgemäß auch unter zellulären Bedingungen in aggregierter Form vorliegen. Das elektronenmikroskopische Erscheinungsbild und die Organisationsstruktur des exprimierten Proteinmaterials innerhalb der Bakterienzellen wurden anhand von Dünnschnitten eingebetteter Zellsuspensionen untersucht, um eine weitere Informationsquelle zum Verhalten der Proteine unter physiologischen Bedingungen zu erschließen.

2.6.1 Einbettung

Zur Gewinnung des einzubettenden Zellmaterials wurden Bakterien im Minikulturmaßstab herangezogen, induziert und wie im Folgenden beschrieben weiterbehandelt. Als Kontrolle diente eine nicht induzierte Kultur des Plasmides p218 #6 im Zustand des exponentiellen Wachstums.

A) Anzucht:

- a) Die Plasmide wurden frisch in die entsprechenden Wirtszellen (s. Kap. 2.3) transformiert und Einzelkolonien in 5 ml LB_(Amp, Cam)-Übernachtskulturen überimpft.
- b) 5 ml LB_(Amp) wurden mit 100 µl der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert.
- c) Induktion mit 1 µM IPTG für 3 h; je zweimal 1,5 ml jeder Kultur wurden getrennt in Eppendorfgefäßen weiterbehandelt.

B) Einbettung:

- a) Pelletieren in der Tischzentrifuge (30 sec 14 000 rpm),
- b) 2 mal waschen (vortexen, pelletieren) in 1ml PBS,
- c) Fixieren in 0,5 ml 2 % Glutaraldehydsg._(PBS) kurz vortexen, pelletieren: über Nacht,
- d) 2 mal waschen in PBS,
- e) Fixieren in 0,5 % OsO₄_(PBS): 2 Stunden,
- f) 3 mal waschen mit 0,5 ml A.bid. (anfängliches Resuspendieren in 100 µl),
- g) Entwässern:
 - 0,5 ml 25 % (v/v) Ethanol: 5 min,
 - 0,5 ml 50 % (v/v) Ethanol: 5 min,
 - 0,5 ml 75 % (v/v) Ethanol: 5 min,
 - 2 mal 0,5 ml 100 % Ethanol: 10 min, Überführen in Rundbodenröhrchen, Anzentrifugieren bei 2 000 x g,
- h) Zugabe von 1 ml Propylenoxid (Abzug; Eindeckeln), aufwirbeln,
- i) Zentrifugieren bei 2 000 x g,
- j) Absaugen (sammeln, nicht vollständig, um Austrocknung zu verhindern),
- k) Sofortige Zugabe von 300 µl 1:1 Epon/Propylenoxid, aufwirbeln, überführen in Beem®-Caps (Spitzboden), zentrifugieren, Überstand sammeln,
- l) Pellet in Epon aufnehmen, mit der Pipette aufwirbeln, zentrifugieren,
- m) Polymerisieren:
 - 70°C über Nacht,
 - 100°C 3 h.

Lösungen:

PBS:	Dulbecco's PBS
Glutaraldehydsg.:	400 µl 50 % (w/v) Glutaraldehyd auf 10 ml PBS
Osmiumtetroxidsg.:	Lösen von 100 mg OsO ₄ in 10 ml A.bid. bei 30°C: 1 % 1:1 Verdünnung mit 2fach konzentriertem PBS
Ethanol:	reinst

2.6.2 Schneiden

Dünnschnitte des eingebetteten Materials wurden am Ultramikrotom mit einem Diamantmesser unter einem Anstellwinkel von 6° angefertigt. Silber irisierende Schnitte einer Dicke von 60 – 120 nm wurden in gefiltertem (0,2 µm) A.bid. auf Schlitznetzchen gefischt.

2.6.3 Kontrastierung

Die Schnitte wurden im Droplet-Verfahren über eine kombinierte Behandlung mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert:

- a) 15 min Behandlung mit Uranylacetatlsg.
- b) waschen mit A.bid.
- c) an Filterpapier trocknen
- d) 1-2 min Behandlung mit Bleicitratlsg.
- e) Waschen mit A.bid.
- f) Trocknen

Lösungen:

Uranylacetatlösung:	5 % (w/v) Uranylacetat in 25 % (v/v) Ethanol	
Bleicitratlösung:	1,33 g Pb(NO ₃) ₂	
	1,76 g Na ₃ Citrat (*2H ₂ O)	ad 42 ml A.bid.
	8 ml NaOH	=> pH 12

Die Lösungen sind über 0,2 µm-Filter zu klären.

2.7 Rotationsbedampfung

Beim Verfahren der Bedampfung werden Proteinlösungen im Hochvakuum langsam eingedampft. Die auf der Unterlage verbleibenden Moleküle oder Aggregate werden aus sehr spitzen Winkel mit Metallpartikeln bedampft, um deren Konturen sichtbar zu machen. Die Objekte zeichnen sich vor einem möglichst homogenen Hintergrund von Metallnebel durch die Partikelanlagerung reliefartig ab. Dabei können nur flüchtige Salze wie Ammoniumformiat oder -acetat in hohen Konzentrationen eingesetzt werden, da eintrocknende Salze selbstverständlich zu Artefakten führen. Um den Eindampfungsprozess zum Schutze der strukturellen Integrität der Objekte zu verlangsamen, wird in Gegenwart von höheren Glycerinkonzentrationen gearbeitet. Die so entstandene Replika der Objekte wird durch eine Schicht von Kohlenstoff stabilisiert und kann auf EM-Netzchen aufgebracht werden. Diese Technik wurde hier zur Bestimmung der Länge der exprimierten stabförmigen Moleküle angewandt. Damit lassen sich zum einen - allerdings in sehr begrenztem Umfang - Aussagen über die Sekundärstruktur treffen: Es muss gewährleistet sein, dass sich die Einzelmoleküle zum funktionellen, *coiled coil*-Dimer zusammenschließen. Da eine einfache α -Helix kaum durch diese

Technik sichtbar zu machen wäre, kann zunächst der Dimerisierungs-Vorgang nachvollzogen werden. Zu welchem Grad dies geschieht, kann jedoch aus demselben Grund nicht direkt bestimmt werden. Erfahrungswerte mit anderen Proteinen in Bezug auf die zu erwartende Moleküldichte lassen jedoch eine grobe Beurteilung zu. Zum anderen lassen sich die Ergebnisse mit den Erwartungen zur Länge von *coiled coil*-Proteinen vergleichen.

2.7.1 Probenvorbereitung

1 ml einer frisch präparierten Proteinlösung wurde im 6 mm-Dialyseschlauch (Optimierung des Oberfläche/Volumen-Verhältnisses) über Nacht gegen 1 l Ammoniumacetat-Lösung dialysiert; der pH dieser Lösung liegt bei 7,4 und wurde nicht nachgestellt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration über den Bradford-Test (Kapitel 2.19) wurde die Lösung zunächst mit 100 %igem Glycerin 1:1 verdünnt (Stammlösung; Endkonzentration Ammoniumacetat: 0,4 M, Glycerin 50 %), um daraufhin ein Aliquot mit ebenso behandelter Dialyselösung auf die fragmentspezifische Konzentration von 10 µg/ml für die kleineren Fragmente (2-x) bzw. 15 µg/ml für die längeren (3-x) zu bringen. Die Proteine bleiben bis zur Bedampfung am selben Tag gekühlt. Die Stammlösung wird mit Protease-Inhibitoren (s. Kap. 2.6.2) versetzt und kann bei - 20° gelagert werden.

Lösung:

Ammoniumacetat-Lösung: 0,8 M Ammoniumacetat

2.7.2 Bedampfung

Die so vorbereiteten Lösungen wurden mittels einer „airbrush“-Pistole in 40 µl-Aliquots aus einem Abstand von ca. 1 m auf die saubere Seite eines frisch gespaltenen Glimmerplättchens gesprüht, bis sich ein gleichmäßiger Nebel aus möglichst kleinen Tröpfchen gebildet hatte. Das Vakuum der BALZERS-Anlage (Elektronenstrahlverdampfer) sollte einen Wert von $< 1 \cdot 10^{-4}$ Torr erreicht haben, bevor unter Rotieren des Probenisches zunächst das gesinterte Platin-Kohle-Gemisch aus einem Winkel von 10° aufgedampft wird. Die Schichtdicke wurde während dessen akustisch und optisch über einen schwingenden Quarzkristall kontrolliert, wobei eine Frequenz von 300 Hz die zu erzielende Schichtdicke von ca. 7 nm anzeigt. Der Kohlefilm wurde aus rechtem Winkel bis zu einer Dicke von 10 nm (Frequenz: ca. 450 Hz) aufgebracht.

Die Replika wurde auf A.bid. (saubere Oberfläche: Josephs-Papier) in einem kleinen Näpfchen vom Träger-Plättchen abgeschwommen und kleinere Teile davon, die sich mit einer Wimper manipulieren und zurecht,„schneiden“ lassen, wurden auf Aceton-gesäuberten Netzen (300 Maschen) gefischt.

EM-Bilder wurden bei einer 40 000fachen Vergrößerung aufgenommen.

2.8 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Proteine fallen mit ihrer großen Anzahl von chiralen C-Atomen in die Klasse der optisch aktiven Substanzen. Die CD-Spektroskopie nutzt die unterschiedliche Absorption der links- und rechtsgerichteten Komponenten linear polarisierten Lichts durch die Probe, indem die Differenz der molaren Absorptionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht (ϵ_L bzw. ϵ_R) gemessen wird. In Analogie zur Absorption wird diese als Elliptizität Θ angegeben:

$$\Theta(\lambda) = \text{const.} (\epsilon_L - \epsilon_R) * c * d \quad c = \text{Konzentration} \quad d = \text{Schichtdicke der Küvette}$$

Die Abhängigkeit der Elliptizität von der Wellenlänge wird im CD-Spektrum aufgezeichnet. CD-Spektren von Proteinen und Peptiden werden im ultravioletten Spektralbereich aufgenommen, in dem charakteristische Elektronenübergänge der Peptidbindungen liegen. Aufgrund der Chiralität der Sekundärstruktur ist das CD-Spektrum von Proteinen äußerst empfindlich für seine Sekundärstruktur.

In der graphischen Darstellung eines Spektrums wird zumeist der "mean residue ellipticity" (MRE)-Wert gegen die Wellenlänge aufgetragen, in den zur Vergleichbarkeit verschiedener Proteine die Anzahl der Aminosäuren einfließt. Die Rohdaten der Elliptizitäts-Messungen in [m deg] werden dazu gemäß folgender Formel in MRE-Werte umgerechnet:

$$\text{MRE} = \frac{\Theta * 0,1 * \text{MRW}}{c * d} \quad \text{mit}$$

$$\text{MRW (mean residue weight)} = \frac{\text{Molekulargewicht}}{\text{Anzahl der Aminosäuren}}$$

2.8.1 Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der Probe wurde in diesem Fall spektroskopisch nach (Pace *et al.*, 1995) bestimmt, um eine Vergleichbarkeit mit Referenzdaten der Literatur zu gewährleisten.

Für Proteine ohne Cystinbrücken etabliert Pace folgende Formel zur Berechnung des molaren Absorptionskoeffizienten bei 280 nm eines Proteins bekannter Aminosäurezusammensetzung, in der die relativen Beiträge der die UV-Absorption beeinflussenden aromatischen Aminosäuren über ihren molaren Absorptionskoeffizienten gewichtet sind:

$$\epsilon_{280} = 5417 * \text{Anzahl Tryptophan} + 1540 * \text{Anzahl Tyrosin}$$

Mit dem gewichtsbezogenen Absorptionskoeffizienten $\epsilon = \epsilon_{280} / \text{MW}$ kann dann über das Lambert-Beer'sche Gesetz $c[\text{mg/ml}] = (E_{280} * d[\text{cm}]) / \epsilon$ aus der Extinktion bei 280 nm die Konzentration errechnet werden. Die Extinktion bei 280 nm wurde zuvor um den durch kolloidale Streuung verursachten Fehler, der sich in einem Maximum bei 333 nm nieder-

2.9 Aggregationsversuche

Allgemein können LMM bzw. Fragmente des aggregationsfähigen Teils des Myosin durch Absenken der Ionenstärke aus Bereichen, in denen die Moleküle in monomerer Form vorliegen, hin zu physiologischen Salzkonzentrationen zur Aggregation gebracht werden, vorausgesetzt die die Löslichkeit determinierenden Bereiche sind vorhanden. Um dies zu erreichen, wird gewöhnlich das Verfahren der Dialyse angewendet, das es erlaubt, bei gleichbleibender Proteinkonzentration die durch Alkalisalze (hier: KCl) einzustellende Ionenstärke vergleichsweise langsam auf entsprechende Endkonzentrationen zu senken. Dabei ist zu bedenken, dass der Konzentrationsausgleich über der semipermeablen Membran nicht linear erfolgt und in der ersten Phase der Dialyse relativ rapide vonstatten geht. Für die Ausprägung des Aggregats, das in meist parakristalliner Form ausfällt und z.B. über Negativ-Kontrastierung elektronenmikroskopisch untersucht werden kann, können intermediäre Assoziationsstadien wie Di- oder Oligomere eventuell über die Ausbildung von filamentösen Zwischenprodukten entscheidend sein. Das bedeutet, dass durch Einfügen von Zwischenschritten oder durch Modifikation der Dialysetechnik ein Einfluss auf die Kinetik der Zusammenlagerung, mithin auf die Ordnung des Endaggregats möglich ist. Alternativ kann die Ionenstärke durch Verdünnen einer Proteinlösung abgesenkt werden (Pepe *et al.*, 1986b). Dabei hat man zwar Kontrolle über die Rate der Konzentrationsänderung, verändert jedoch stetig die Proteinkonzentration.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die großen Fragmente für Dialyse-Ansätze in Konzentrationen von 0,2 mg/ml, die kleineren zu 0,14 mg/ml eingesetzt (ca. 3 μ M). Als Puffersubstanzen wurden Histidin und Imidazol in Konzentrationen von 10 mM (pH 7,2) eingesetzt, des Weiteren waren sämtliche Aggregationspuffer mit 2 mM $MgCl_2$ und 0,02 % NaN_3 supplementiert. Alle Schritte wurden im Kühlraum bzw. auf Eis ausgeführt.

Jeweils ein Tropfen der Aggregat-Suspensionen wurde zur Negativ-Kontrastierung (s. Kap. 2.16) verwendet.

Lösung:

Aufbewahrungspuffer:	0,6 M KCl
pH 7,2	10 mM Imidazol
	0,02 % (w/v) NaN_3

2.9.1 Zwei-Schritt-Gradienten-Dialyse

Neben einem vereinfachten Verfahren zur Absenkung der Ionenstärke, d.h. der Dialyse eines Aliquots von wenigen hundert μ l Fragment-Lösung in Hochsalzpuffer (meist Aufbewahrungspuffer) gegen mindestens das 100fache Volumen einer Lösung niedriger Ionenstärke, wurde auch eine Absenkung in zwei Schritten durchgeführt: Nach erster Dialyse gegen einen

Puffer mittlerer Ionenstärke (0,4 oder 0,3 M KCl im jeweiligen Puffersystem) wurde eine verlangsamt zweite Dialyse angeschlossen (Quinlan & Stewart, 1987). Hierzu wurde der Proben-Dialyse-Schlauch nach dem ersten Schritt in einen Schlauch größeren Durchmessers überführt, der mit dem 20fachen Volumen der zu dialysierenden Probe mit erstem Dialysepuffer gefüllt und gegen ein entsprechend mindestens 100faches Volumen Endpuffer für mindestens 12 Stunden dialysiert wurde. So stellen sich zwei Gradienten ein, die den Austausch im Probeschlauch entscheidend verlangsamen.

2.9.2 Mehrschritt-Dialyse

In einzelnen Fällen wurde unter täglichem Wechsel der Lösung eine mehrstufige Dialyse gegen Puffer absteigender Ionenstärke durchgeführt; dabei enthielt der Dialysepuffer KCl in Konzentrationen von 0,3; 0,2; 0,15; 0,1 und 0,05 M.

2.9.3 SDP (Standard-Dilution-Procedure) nach Pepe *et al.* (1986)

Ein Verdünnungs-Ansatz zur rapiden Absenkung der KCl-Konzentration wurde nach Anleitung durch Dr. Prokash Chowrashi (Philadelphia) in zwei Abschnitten wie folgt vorgenommen:

Zunächst wurden Aliquots der Proteinlösungen gegen Imidazol-Hochsalz-Puffer dialysiert. 200 µl dieser Lösungen wurden im ersten Schritt durch 14-malige Zugabe von 14,3 µl Imidazol-Puffer unter ständigem, vorsichtigem Rühren auf eine Konzentration von 0,3 M KCl abgesenkt, wobei die einzelnen Additionen im Abstand von exakt 5 sec erfolgten.

Der Ansatz wurde für 10 min ruhen gelassen, bevor je nach gewünschter KCl-Endkonzentration der zweite Verdünnungsschritt in 60 Applikationen von entweder 6,7 µl (0,15 M KCl) oder 33,3 µl (0,05 M KCl) Imidazol-Puffer durchgeführt wurde ($\Delta t=5$ sec).

Lösungen:

Imidazol-Hochsalz-Puffer: pH 7,2	0,6 M KCl 10 mM Imidazol 2 mM MgCl ₂ 0,02 % (w/v) NaN ₃
Imidazol-Puffer:	10 mM Imidazol 2 mM MgCl ₂ 0,02 % (w/v) NaN ₃

2.9.4 Paramyosin-Koaggregation

Für die Koaggregations-Ansätze von Fragmenten mit Paramyosin wurden nicht eingefrorene Stammlösungen der beiden Komponenten in 1:1 molarem Verhältnis in Lösungen hoher Ionenstärke (0,6 M KCl) bei einer Paramyosin-Konzentration von 0,2 mg/ml gemischt. 100 µl dieses Gemischs wurden in einer verlangsamt Gradientendialyse (s. Kap. 2.10.1;

30faches Volumen 0,6 M KCl-Puffer im äußeren Dialyseschlauch) gegen Koaggregationspuffer dialysiert.

Lösung:

Koaggregationspuffer:	0,15 M KCl
pH 7,2	10 mM Imidazol bzw. Histidin
	2 mM MgCl ₂
	0,02 % (w/v) NaN ₃

2.10 Löslichkeitsuntersuchungen

Die Löslichkeitscharakteristiken der Fragmente wurden in einem Sedimentationsassay untersucht. Hierzu wurden Aliquots der Proteine in Lösung, d.h. bei hoher Ionenstärke, gegen Histidin-Puffer variabler KCl-Konzentration dialysiert, die gebildeten Aggregate durch Zentrifugation sedimentiert und das im Überstand verbliebene Protein über den Bradford-Test (Kap. 2.20) bestimmt. Eine Quantifizierung des Pellet-Proteins schließt sich aus mehreren Gründen aus: zum einen lässt sich das ausgefallene Material nicht vollständig aus dem Dialyseschlauch wiedergewinnen, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass das Pellet im Proteintest nicht quantitativ resolubilisiert werden kann. Die Bezugsgröße (100 %-Wert) stellt die Proteinlösung vor Dialyse dar.

Im Einzelnen wurden die Proteine in Aufbewahrungspuffer zunächst auf eine Konzentration von 0,3 mg/ml (Fragmente 3-x) bzw. 0,2 mg/ml (Fragmente 2-x) eingestellt, die molare Konzentration damit konstant gehalten. Jeweils zwei 100 µl-Aliquots dieser Lösung wurden gegen 100 ml des jeweiligen Puffers über Nacht bei 4°C dialysiert. Die Proben wurden 10 min bei 30 000 x g im gekühlten Rotor abzentrifugiert und je 40 µl des Überstandes für den Bradford-Test mit entsprechender Korrektur um den Puffer-Blindwert eingesetzt.

Lösungen:

Aufbewahrungspuffer:	0,6 M KCl
pH 7,2	10 mM Imidazol
	0,02 % (w/v) NaN ₃
KCl-Puffer (variabel):	0,05 – 0,6 M KCl
pH 7,2	10 mM Histidin
	2 mM MgCl ₂
	0,02 % (w/v) NaN ₃

2.11 Reinigung von Paramyosin und Projectin

Die akzessorischen Proteine der dicken Filamente aus Insektenmuskeln wurden aus der indirekten Flugmuskulatur des Totenkopf-Falters *Acherontia atropos* gereinigt.

2.11.1 Myofibrillen-Reinigung

Dazu wurden die longitudinalen und dorsoventralen Thoraxmuskeln von sechs tiefgefrorenen Tieren aus hauseigener Zucht präpariert und in 50 ml eiskaltem Waschpuffer unter Verwendung eines Potters (ca. 200 rpm Pistillrotation; Eiskühlung) homogenisiert. Im Verlauf der folgenden Waschschriffe werden lösliche und kleinere Zellbestandteile nach Zerstörung der Membransysteme durch das ionische Detergens Triton von den Myofibrillen abgetrennt und so der kontraktile Apparat isoliert, aus dem in der Folge selektiv Proteinfractionen extrahiert werden können. Die gesamte Präparation wurde auf Eis bzw. bei 4°C Kühlung durchgeführt und allen Puffern Protease-Inhibitoren (s. Kap. 2.6.2) zugesetzt.

Jeder Waschschriff bestand aus Resuspension (Potter) des Pellets in 50 ml des jeweiligen Puffers und 10-minütiger Zentrifugation bei 3 000 x g. Es wurde, bis jeweils klare Überstände erhalten wurden, in drei Abschnitten gewaschen: viermal mit Waschpuffer, fünfmal mit Waschpuffer + Triton und abschließend zur Entfernung des Detergens dreimal ohne Triton.

Lösungen:

Waschpuffer:	50 mM NaCl
pH 7,0	15 mM Na ₂ HPO ₄
	1 mM DTT
	1 mM EDTA
Waschpuffer + Triton:	0,5 % (v/v) Triton X-100 in Waschpuffer

2.11.2 Extraktion

Die Extraktions- und Reinigungsbedingungen waren im Arbeitskreis durch Bernd Kölsch etabliert und optimiert worden (Kölsch *et al.*, 1995) und wurden unter kleineren Modifikationen übernommen. Dabei sind einige kritische Parameter zu beachten. Die zu erzielende Reinheit ist wesentlich durch die Zusammensetzung, d.h. Kontamination des Rohextraktes bestimmt, so dass möglichst milde Bedingungen bezüglich der verwendeten Ionenstärke und der mechanischen Behandlung gewählt werden müssen.

Das letzte Pellet der Myofibrillen-Reinigung wurde vorsichtig (kurz bei langsamer Drehzahl) in 50 ml Extraktionspuffer gepottert und 40 min ohne mechanische Agitation auf Eis inkubiert. Die Klärung des Extraktes erfolgt in zwei Schritten über eine hochoourige Zentrifugation für 20 min bei 20000 x g und Filtration über 0,45µm-Feinfilter.

Lösung:

Extraktionspuffer:	1 % (w/v) Na ₄ P ₂ O ₇
pH 8,3	10 mM Tris/H ₃ PO ₄
	1 mM CaCl ₂

2.11.3 Anionenaustausch-Chromatographie

Die Reinigung der Proteine erfolgt über Anionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung des FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)- Systems der Firma Pharmacia. Die speziellen Matrices erlauben die Arbeit unter hohem Druck, was die im Vergleich zur gewöhnlichen Flüssig-Chromatographie überragende Trennschärfe bedingt. Alle in diesem System verwendeten Puffer wurden über 0,45 µm-Membranen filtriert und entgast; die Anlage wurde im Kühlraum betrieben.

Die Bindung der Zielproteine an die MonoQ- Matrix erfolgt nicht in Gegenwart des gängigerweise als Säulengegenion eingesetzten Chlorid-Ions, so dass vor dem Säulenlauf das Gegenion durch Phosphat ersetzt werden muss. Aus diesem Grund wurde der pH des Extraktions- und Säulenpuffers A mit Phosphorsäure eingestellt. Zum Chlorid-Phosphat-Austausch wurde die MonoQ HR 10/10-Säule mit 1 M HCl vorbehandelt und mit 5 N NaOH beschickt und inkubiert, um die Chlorid-Ionen zu lösen. Die Säulenvorbereitung wurde durch ausgiebige Äquilibration mit Säulenpuffer A bis zur Stabilisierung des pH abgeschlossen, wobei gleichzeitig die funktionellen Gruppen der Matrix mit Phosphat-Ionen (Phosphorsäure) besetzt werden. Die regenerierte (s.u.) Säule entwickelt bei einer Pumpgeschwindigkeit von 1 ml/min einen Gegendruck von kleiner 1 MPa.

Der Probenauftrag erfolgte über ein 50 ml-Reservoir (Superloop) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min, wobei der Druck nicht über 2,5 MPa steigen sollte. Der lineare Gradient (0-100 % Säulenpuffer B) eines Gesamtvolumens von 80 ml wurde im Anschluß an das Erreichen der Basislinie mit einer Pumpgeschwindigkeit von 1 ml/min gestartet und 1 ml-Fractionen gesammelt. Die Säule wurde durch eine kombinierte Behandlung mit 75 %iger Essigsäure (v/v), 1 N NaOH und 2 M NaCl gereinigt und regeneriert.

Vor der Weiterverarbeitung wurde die Reinheit einzelner Fractionen über SDS-PAGE geprüft. Reine Fractionen wurden vereinigt und je nach Verwendungszweck unterschiedlich für die Aufbewahrung vorbereitet. Ein Teil der resultierenden Paramyosin-Lösung, der für anschließende Koaggregationsversuche bestimmt war, wurde nach Dialyse gegen Aufbewahrungspuffer und Zugabe von Protease-Inhibitoren (s. Kap. 2.6.2) auf Eis bei 4°C aufbewahrt. Der Rest der gereinigten Proteine, die für Bindungsversuche im ELISA-Test eingesetzt werden sollten, wurde nach 1:1-Verdünnung mit Glycerinpuffer (zur Minimierung von Verlusten durch Volumenverminderung bei der Dialyse) bei -20°C aufbewahrt.

Lösungen:

Säulenpuffer A:	10 mM Na ₄ P ₂ O ₇
pH 8,0	2,5 mM Tris/H ₃ PO ₄
Säulenpuffer B:	10 mM Na ₄ P ₂ O ₇
pH 8,0	2,5 mM Tris/Cl
	0,5 M NaCl

Aufbewahrungspuffer: pH 7,2	0,6 M NaCl 10 mM Imidazol 0,02 % (w/v) NaN ₃
Glycerinpuffer: pH 7,5	40 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 10 mM Tris/Cl 0,02 % (w/v) NaN ₃ 50 % (v/v) Glycerin

2.12 Quantitativer Bindungstest

Die Interaktion der exprimierten LMM-Fragmente mit Proteinen der dicken Filamente aus Insektenmuskeln wurde in einem speziellen ELISA-(Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)-Bindungstest quantitativ bestimmt. Hierbei wurde ein potentieller physiologischer Bindungspartner an der Oberfläche der Kavitäten ("wells") von Mikrotiterplatten immobilisiert und die Bindung der LMM-Liganden in Verdünnungsreihen über eine nachgeschaltete Enzymreaktion, die ein photometrisch zu quantifizierendes chromogenes Substrat umsetzt, erfasst. Durch die enzymatische Verstärkung ist man über ELISA-basierende Methoden in der Lage, Proteinmengen im ng-Bereich zu detektieren. Die hohe Sensitivität, verbunden mit der Möglichkeit, diese Tests im Mikrotiter-Platten-Maßstab durchzuführen, erlaubt eine sehr effiziente Analyse von Interaktionscharakteristiken *in vitro*.

Prinzipiell stehen für das Detektionsverfahren, d.h. für die spezifische Kopplung des Nachweisenzyms an den zweiten Bindungspartner unterschiedliche Alternativen zur Verfügung. In der gängigen Variante wird der Ligand über eine ein- oder zweistufige Antikörper-Reaktion nachgewiesen. Das Enzym, zumeist Peroxidase, ist dabei kovalent direkt an den primären Antikörper oder an einen sekundären Antikörper gegen den artspezifischen F_c-Teil des Erstantikörpers gebunden. Zwar steht im Arbeitskreis ein polyklonales Serum gegen Insekten (*Locusta migratoria*)- Myosin zur Verfügung, jedoch sprechen mehrere Gründe gegen die Verwendung dieser Antikörperfraktion. Der Anteil an Antikörpern gegen den LMM-Abschnitt des Moleküls ist aufgrund der geringen Immunogenität des *coiled coils* naturgemäß sehr gering. Die ubiquitäre Verbreitung des Heptad-Motivs und die vergleichsweise kompakte Struktur bedingen diese eingeschränkte Immunantwort. Gewichtiger noch ist aber die Tatsache, dass Paramyosin und LMM aus Insektenmuskeln eine hohe Homologie aufweisen; Kreuzreaktionen würden die quantitative Auswertung zumindest sehr erschweren. Aus diesen Gründen wurden verschiedene monoklonale Antikörper (von Dr. Bellinda Bullard zur Verfügung gestellt) auf ihre Eignung für den Nachweis getestet. Aus theoretischen Überlegungen ist dieser Nachweis nur als zweite Wahl anzusehen: Ist das entsprechende Epitop in die Interaktion involviert, kann dies entweder den Nachweis verhindern oder aber aufgrund der zu erwartenden höheren Affinität der Antikörper zu Verfälschungen führen. Die Reaktion der monoklonalen Antikörper war durchweg schwach, auch dieser Weg musste als ungeeignet eingestuft werden.

Der Nachweis eines Proteins über das Biotin-Avidin-System bietet sich in diesem Fall als Alternative an. Dabei wird das Zweitprotein zunächst mit Biotin (Amidbindung an freie Aminogruppen) markiert und der Nachweis erfolgt über ein Avidin-Peroxidase-Konjugat. Bei dieser Vorgehensweise sind zwei Faktoren zu bedenken. Zunächst kann das Bindungsverhalten durch die Anwesenheit der gekoppelten Gruppe verändert werden und zweitens wird der Biotinylierungsgrad unterschiedlicher Präparationen nicht identisch sein. Da es sich im Ersteren um einen systematischen Fehler handelt, sollte die Vergleichbarkeit der Proben untereinander nicht betroffen sein; jedoch sind Aussagen über die absolute Bindungsstöchiometrie nur eingeschränkt möglich. Dieser Punkt gilt jedoch allgemein für diese Versuchsanordnung, da die Menge an tatsächlich an die Polystyrol-Oberfläche gebundenem Protein sowohl für den vorgelegten Partner als auch für Kalibrierreihen des Sekundärproteins kaum bestimmbar ist. Die Ergebnisse einer solchen Untersuchung müssen grundsätzlich als relativ eingestuft werden, was die Aussagefähigkeit über bevorzugtes Bindungsverhalten an ein spezielles vorgelegtes Protein nicht beeinträchtigt.

Aufgrund der zweiten Einschränkung variabler Biotinmarkierung wurde für jedes Protein auf jeder Platte eine eigene Kalibrierreihe angesetzt.

Die Pufferbedingungen für den gesamten Test wurden in zweierlei Hinsicht optimiert. Um eine Vergleichbarkeit mit anderen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu gewährleisten, sollte nicht vom Imidazol/Histidin-System abgewichen werden. Imidazol wurde als Puffersubstanz gewählt, da sich in Vortests die Bindung einzelner Proteine als im Vergleich zu Histidin effektiver herausgestellt hatte. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass sich kleinere Unterschiede unter diesen Bedingungen deutlicher hervorheben würden. Da *coiled coil*-Proteine aufgrund ihres modularen Aufbaus im Allgemeinen zu einer relativ hohen unspezifischen Bindung neigen, wurde die Reaktion auf die gängigen Blockreagenzien getestet. Die Bindung an Magermilchpulver (MMP) stellte sich als optimal im Vergleich zu BSA, Tween 20 und Gelatine-Blockreagenz heraus. Die eigentlichen Bindungsmessungen wurden um die jeweilige Bindung an das verwendete Blockierungsagens korrigiert.

Aus Gründen der Verfügbarkeit wurden die gereinigten Insektenproteine als erster Bindungspartner eingesetzt. Die Inkubation aller Bindungsschritte wurde zur Erhöhung der Spezifität bei 37°C durchgeführt.

2.12.1 Biotinylierung

Die Bedingungen orientieren sich an Produktinformationen der Hersteller zu Biotin-7-NHS (Roche, Deutschland) und Entsalzungssäulen PD10 (Pharmacia, Schweden). In einem Gesamtvolumen von 2,5 ml wurden Biotinylierungs-Reagenz (2 mg/ml Kopplungspuffer) und 1 mg zu markierendes Fragment in Kopplungspuffer (entspricht Aufbewahrungspuffer) in

einem molaren Verhältnis von annähernd 50:1 gemischt (0,15 ml Biotinylierungsreagenz für 3-X-Fragmente bzw. 0,225 ml für 2-X-Fragmente) und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Überschüssiges Biotinylierungs-Reagenz wurde in zwei Schritten entfernt: 1. Entsalzung über PD10-Gelfiltrationssäulen nach Angaben des Herstellers (Elution in 3,5 ml Kopplungspuffer). 2. Übernacht-Dialyse gegen Kopplungspuffer. Im Anschluss erfolgte eine Bradford-Bestimmung (Kap. 2.20).

2.12.2 Plattentest

Der Bindungstest wurde im Einzelnen in einem Arbeitsvolumen von 100 µl wie folgt durchgeführt (Waschen der Platte: 3 x 200 µl des jeweiligen Puffers):

Die gereinigten Proteine aus Insektenflugmuskeln, Paramyosin und Projectin, wurden aus einer Stammlösung (s. Kap. 2.12) auf eine Konzentration von 150 ng Paramyosin bzw. 600 ng Projectin pro 100 µl mit Coatingpuffer verdünnt.

Eine 1:1-Verdünnungsreihe (6 Konz.) des markierten Fragments von 200 ng/100 µl abwärts für 3-X-Fragmente bzw. 150 ng/100 µl abwärts für 2-X-Fragmente wurde in Coatingpuffer angesetzt.

Die Bindung von Primär- und Kalibrierprotein an die Platte erfolgte über eine Stunde bei 37°C, die Platte wurde mit Coatingpuffer gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden mit 1 % (w/v) MMP in Coatingpuffer eine halbe Stunde (37°C) geblockt, die Platte mit Bindungspuffer gewaschen.

Biotinylierte Fragmente wurden mit Bindungspuffer_{MMP} auf Konzentrationen von 2,4 µg/100µl (3-x) bzw. 1,6 µg/100µl (2-x) eingestellt und seriell 1:1 verdünnt (6 Konz.); Inkubation für eine Stunde bei 37°C, Waschen mit Bindungspuffer.

Avidin-POD (5 µg/ml; 1:200 in Bindungspuffer_{MMP})- Kopplung erfolgte ebenfalls eine Stunde lang bei 37°C, gefolgt von einer Waschprozedur mit Bindungspuffer. Die Platte wurde mit Entwicklungsreagenz beschickt und bei 37°C über einen Zeitraum von 15 bis 45 min entwickelt, wobei in Abständen die OD₄₀₅ im ELISA-Reader kontrolliert wurde, um eine Überentwicklung (OD > 1,0) zu vermeiden. *Readings* mit optimaler OD-Verteilung wurden ausgewertet.

Lösungen:

Kopplungspuffer:	0,6 M KCl
pH 7,2	10 mM Imidazol
	0,02 % (w/v) NaN ₃
Biotinylierungsreagenz:	2 mg/ml Biotin-7-NHS Kopplungspuffer
Coatingpuffer:	0,3 M NaCl
pH 7,2	2,135 g/l Na ₂ HPO ₄ / 0,489 g/l KH ₂ PO ₄
	0,02 % (w/v) NaN ₃

Bindungspuffer:	0,15 M KCl
pH 7,2	10 mM Imidazol
(frisch)	2 mM MgCl ₂
Bindungspuffer _{MMP} :	Bindungspuffer + 0,05 % (w/v) MMP
Entwicklungslösung:	12,5 mM Zitronensäure
pH 5,5	25 mM Na ₂ HPO ₄
(frisch)	0,05 % (w/v) OPD
	0,03 % (v/v) H ₂ O ₂

2.13 *in situ*-Phosphorylierung von Muskelzell-Proteinen

Die Möglichkeit einer Phosphorylierung von Myosin-Schweren Ketten im Flugmuskelgewebe von *Drosophila* wurde durch eine Untersuchung des Phosphat-Einbaus in Proteine der Thorax-Muskelzellen in einem radioaktiven Test überprüft. Hierzu wurden abgetrennte Thoraces in Gegenwart von ³²P-*ortho*-Phosphat inkubiert, die Myofibrillen über differentielle Zentrifugation abgetrennt und das Phosphorylierungsmuster der Zellproteine über zwei-dimensionale Gelelektrophorese, d.h. Autoradiographie eines Blots 2-D-getrennter Proteine, analysiert. Zur Identifizierung der Position der Schweren Ketten auf dem Blot wurde eine Anfärbung mit einem polyklonalen anti-*Locusta*-Myosin-Serum durchgeführt.

2.13.1 Markierungsansatz

Die Fliegen wurden zunächst in ihren Anzuchtröhrchen eisgekühlt und die Thoraces nach sorgfältiger Entfernung der Beine unter dem Binokular bis zum Start des Phosphorylierungsversuchs in HBS (HEPES-buffered saline) auf Eis aufbewahrt.

Alle folgenden Schritte wurden unter Einhaltung der entsprechenden Sicherheitsvorschriften und Vorsichtsmaßnahmen im Isotopenlabor durchgeführt. 20 Thoraces wurden in 2 ml Medium bei Raumtemperatur überführt, die Markierung durch Zugabe von *o*-Phosphat (1 mCi) gestartet und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert (van den Bos *et al.*, 1996). Das Medium wurde über eine Einmal-Fritte (entleerte Pharmacia-PD10-Säule) entfernt und die Thoraces in einem 2 ml-Pottergefäß in 1 ml Waschpuffer vorsichtig, aber unter deutlicher Schereinwirkung homogenisiert.

Die folgenden drei Säuberungsschritte in je 1 ml Waschpuffer konnten im Eppendorfgefäß (mit Sicherheitsverschluss) vorgenommen werden, wobei das Pellet der 10-minütigen Zentrifugation bei 3 000 x g jeweils durch Rühren und vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (Filtertips!) resuspendiert wurde. Das resultierende Pellet wurde in 220 µl IEF-Lösung aufgenommen, 3 min im Ultraschallbad behandelt, 30 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert und wiederum 1 min beschallt.

Lösungen:

HBS (HEPES-buffered saline): pH 7,2	140 mM NaCl 20 mM Hepes 25 mM NaHCO ₃ 10 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 5 mM Glucose
Waschpuffer: pH 7,0	50 mM NaCl 15 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM DTT 1 mM EDTA
IEF-Lösung:	8 M Harnstoff 2 % (w/v) Chaps 5 % (v/v) Ampholyt (Servalyt pH 3-10)

2.13.2 Isoelektrische Fokussierung

Das Eingießen der Probe in die Gellösung hat sich insbesondere für die Auftrennung von myofibrillären Proteinen mit hohem Molekulargewicht als vorteilhaft erwiesen (Ziegler *et al.*, 1994), da diese trotz geringer Acrylamidkonzentration bei Auftrag auf ein Röhrchengel vergleichsweise stark in ihrer Wanderung behindert sind.

Je 100 µl (entspricht 10 Thoraces) des End-Überstandes einer 20 000 x g-Zentrifugation des beschallten Ansatzes wurden mit 2,4 ml IEF-Gellösung vermischt und die Röhrchen-Gele (5 mm Innendurchmesser, Länge 11,5 cm) für die erste Dimension nach Zugabe von 4 µl TEMED und 5 µl APS-Lösung für zwei Stunden auspolymerisiert.

Die Fokussierung wurde in einer hauseigenen Kammerkonstruktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

0,5 h 100 V – 1 h 200 V (Vorfokussierung zur Entfernung von Salzresten) – 11 h 500 V – 1 h 800 V (= 6550 Vh)

Vor dem Auspressen der Gele mit 0,1 % SDS-Lösung unter Verwendung einer Spritze mit stumpfer Kanüle wurde das saure Ende mit 0,2 % BPB-Lösung markiert. Die Gele wurden unter zweimaligem Wechsel für jeweils 5 min in 5 ml Äquibrierlösung für die zweite Dimension vorbereitet. Im letzten Äquibrierungsschritt wurde eine Spatelspitze BPB zugesetzt.

Lösungen:

IEF-Gellösung:	4 % (w/v) Acrylamid in IEF-Lösung
Acrylamid-Stammlsg:	30 % (w/v) Acrylamid; 1,6 % (w/v) N,N'-Methylen-Bisacrylamid
APS-Lösung:	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
Kathodenlösung:	20 mM NaOH
Anodenlösung:	10 mM Phosphorsäure
Äquibrierlösung: pH 6,8	2 % (w/v) SDS 60 mM Tris/HCl 10 % (v/v) Glycerin 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol

2.13.3 SDS-PAGE und Blot

Die zweite Dimension in Form von 1,5 mm dicken SDS-Gradienten-Großgelen (5-15 %) wurde in einer Bio-Rad-Anlage mit zugehöriger Ausstattung durchgeführt. Dabei wurde das Sammelgel durch eine 2 cm dicke Agarose-Matrix ersetzt, die keinen Retentionseffekt auf die Proteine ausübt. Der Molekulargewichtsstandard wurde zuvor auf Filterpapier aufgetragen, dieses getrocknet und neben dem Röhrchen-Gel in die noch nicht ausgehärtete Agarose-Matrix eingebracht. Ansonsten wurde verfahren wie in Abschnitt 2.21 ausgeführt.

Das Gel wurde in Transferpuffer äquilibriert und die Proteine im Semidry-Verfahren bei 1,5 mA/cm² für 3 Stunden auf Nitrocellulose-Membran geblottet. Der Molekulargewichtsstandard wurde getrennt mit "India-ink"-Lösung gefärbt.

Dieser Blot wurde nun in drei Stufen analysiert: Zunächst wurde mit dem getrockneten Blot eine Autoradiographie (-70°C) mit mehreren Filmen durchgeführt, die in Abständen entnommen und entwickelt werden konnten. Im Anschluss wurden die Proteine mit dem leicht wieder auszuwaschenden "Fast Green"-Farbstoff allgemein gefärbt, um nach Entfärbung abschließend über einen polyklonalen Antikörper spezifisch Myosin zu lokalisieren.

Nach halbstündiger Absättigung freier Bindungsstellen der Membran mit Blockpuffer erfolgte die Myosin-Markierung mit polyklonalem anti-Heuschrecken-Myosin-Serum (von Dr. Clemens Ziegler, Münster; 1 h; 1:600 in Verdünnungspuffer). Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde ebenfalls für 1 Stunde mit sekundärem Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG/Peroxidase-Konjugat (Sigma); 1:2000 in Verdünnungspuffer) inkubiert. Nach abermaliger Waschprozedur mit PBS wurde der Blot in Färbelösung entwickelt, mit Stopplösung die Reaktion beendet und getrocknet.

Lösungen:

4fach Sammelgelpuffer: pH 6,8	0,5 M Tris-Cl 0,4 % (w/v) SDS
Agarose-Sammelgel:	1 % (w/v) Agarose in 1fach Sammelgelpuffer
Transferpuffer:	192 mM Glycin 25 mM Tris (untitriert)
Fast Green-Lösung:	2 % (w/v) FastGreen
"India-ink"-Lösung:	1% (v/v) Füllertinte in PBS
PBS: pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄
Blockpuffer:	5 % (w/v) BSA in PBS
Verdünnungspuffer:	1 % (w/v) BSA in PBS
TBS: pH 7,5	150 mM NaCl 25 mM Tris
Färbelösung:	50 mg 4-Chloro-1-Naphtol 17 ml Ethanol 83 ml TBS 100 µl H ₂ O ₂ (30%)
Stopplösung:	1 % (w/v) NaN ₃

2.14 *in vitro*-Phosphorylierung von LMM-Fragmenten

Die Phosphorylierbarkeit von LMM-Fragmenten durch *Drosophila*-Muskelfraktionen wurde anhand einer *in vitro* Phosphat-Markierung der kleineren Fragmente untersucht. Das hier verwendete Puffersystem orientiert sich an Bedingungen, die im Arbeitskreis etabliert worden waren (Breuer, 1982) und unter denen eine Phosphorylierung speziell von Paramyosin beobachtet werden konnte. Da zunächst qualitativ überprüft werden sollte, ob eine solche Phosphorylierung überhaupt stattfinden kann, wurde dieser Pilotansatz mit Kinase-Aktivatoren wie cAMP und Kalzium supplementiert.

Grundsätzlich wurde bei der Fraktionierung der Muskelzellkomponenten so vorgegangen, dass in einem ersten Schritt das Gewebe, d.h. die Thoraces bzw. die Cuticulae unter starker Scherung im Potter homogenisiert wurde, wobei auch die Zellmembranen der vergleichsweise riesigen Myocyten zerstört werden. Der erste Überstand des bei 10 000 x *g* zentrifugierten Homogenisats enthält dann hauptsächlich Komponenten des Cytosols der Muskelzellen. Daraufhin wurden, prinzipiell wie in Abschnitt 2.12.1 beschrieben, Myofibrillen gereinigt und in mehreren Schritten sukzessive mit steigenden Ionenstärken extrahiert.

Der erste Überstand wurde als Fraktion I, die Extraktions-Überstände mit 5, 15 und 40 mM Pyro-Phosphat respektive als Fraktionen II, III und IV bezeichnet. Im Einzelnen wurde wie folgt unter Eiskühlung bzw. bei 4°C präpariert:

2.14.1 Thorax-Präparation

Ungefähr 350 Thoraces wurden aus vorsichtig in flüssigem Stickstoff gemörserten Fliegen unter dem Binokular gesammelt, in einem Volumen von 2 ml Waschpuffer gepottert und 10 min bei 10 000 x *g* zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde als A I-Fraktion aufbewahrt und des weiteren die Myofibrillen 3 mal mit Waschpuffer, 2 mal mit Waschpuffer + Triton, und schließlich 2 mal mit Waschpuffer gereinigt (Volumen: jeweils 2 ml), wobei die Zentrifugationen bei 3 000 x *g* erfolgten. Die seriellen Extraktionen wurden unter Rühren für 20 Minuten mit je 0,5 ml Extraktionspuffer 1, 2 und 3 durchgeführt. Die Überstände der Zentrifugationen bei 8 000 x *g* bzw. 15 000 x *g* nach der letzten Extraktion wurden als A II – A IV aufbewahrt.

2.14.2 Cuticula-Präparation

Ungefähr 250 Larven wurden unter dem Binokular längs aufgeschnitten, das Innere ausgeschabt und die Cuticulae zum Auswaschen in Waschpuffer gesammelt. Vor der Homogenisation wurde dieser Waschpuffer 2 mal über eine Fritte entfernt und ausgetauscht. Als L I-Fraktion wurde der Überstand eines 1 ml-Homogenats (Potter) nach 10 000 x *g*-Zentrifugation aufbewahrt. Die Waschschrte wurden wie bei der Thorax-Präparation, jedoch in einem

Volumen von 1,5 ml und Zentrifugation bei 10 000 x g (wegen des sehr unkompakten Pellets) durchgeführt. Extrahiert wurde in diesem Fall in einem Volumen von je 300 µl und Zentrifugation bei 20 000 x g. Die Bezeichnung dieser Fraktionen ist analog L II, III und IV.

Lösungen:

Waschpuffer: pH 7,0	50 mM NaCl 15 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM DTT 1 mM EDTA Protease-Inhibitoren (s. Kap. 2.6.2)
Waschpuffer + Triton:	0,5 % (v/v) Triton X-100 in Waschpuffer
Extraktionspuffer 1: pH 8,0	5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 10 mM Tris 1 mM DTT Protease-Inhibitoren (s. Kap. 2.6.2)
Extraktionspuffer 2: pH 8,0	15 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 10 mM Tris 1 mM DTT Protease-Inhibitoren (s. Kap. 2.6.2)
Extraktionspuffer 3: pH 8,0	40 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 10 mM Tris 1 mM DTT Protease-Inhibitoren (s. Kap. 2.6.2)

2.14.3 Phosphorylierungs-Ansatz

Aliquots der Fragmente in Aufbewahrungspuffer wurden über Nacht gegen Phosphorylierungspuffer dialysiert und die Proteinkonzentration der dialysierten Proben über den Bradford-Test (Kap. 2.20) bestimmt, um die Konzentration auf 0,3 mg/ml einzustellen. Die Ansätze und Kontrollen wurden wie folgt pipettiert:

Tab. 2-6: Pipettierschema für Phosphorylierungs-Versuche

	Fragment	cAMP (10x)	Ca-EGTA (10x)	ATP (10x)	Puffer	Fraktion	Gesamt
LMM-P_i	30 µl	5 µl	5 µl	5 µl	-	5 µl	50 µl
Kontrolle 1	30 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	-	50 µl
Kontrolle 2	-	5 µl	5 µl	5 µl	30 µl	5 µl	50 µl

Nach Start der Reaktion durch Zugabe der entsprechenden Muskelfraktion wurde für exakt 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Reaktion mit 50 µl Harnstoff-Probenpuffer gestoppt wurde.

Die Proben konnten so bei -20°C aufbewahrt werden. Vor dem Gellauf mit einem Auftrag von 10 µl dieser Gelproben wurden diese für 3 min bei 70°C erhitzt.

Die Gele wurden jeweils für 2 Tage zwischen Zellophanpapier im Luftstrom unter dem Abzug getrocknet und mit dem Fuji-Bas-System der Fa. Raytest ausgewertet. Die Gele aller Ansätze

ze wurden 14 Tage nach der Reaktion für 4 Stunden auf „Phospho-Imaging“-Platten exponiert und über die TINA-Software analysiert.

Lösungen:

Phosphorylierungspuffer: pH 7,0	0,2 M KCl 30 mM Glycerolphosphat 10 mM Magnesiumacetat 1,2 mM Theophyllin 1 mM DTT 1 mM Natriumfluorid
10fach cAMP-Lösung:	10 mM cAMP in Phosphorylierungspuffer
10fach Ca-EGTA-Lösung:	50 mM CaCl ₂ , 50 mM EGTA in Phosphorylierungspuffer
10fach ATP-Lösung:	1 mM ATP, 2 µCi γ- ³² P-ATP / 5 µl
Harnstoff-Probenpuffer: pH 6,8	4 M Harnstoff 156 mM Tris 5,5 % (w/v) SDS 12,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 12,5 mM EDTA

2.14.4 Aggregation *in vitro* phosphorylierter Fragmente

Um einen möglichen Einfluss der Phosphorylierung auf das Aggregationsverhalten zu untersuchen, wurde beispielhaft das Fragment 2-19 wie oben in einem nicht-radioaktiven Ansatz dreifachen Volumens behandelt, um im Anschluß durch Dialyse gegen Aggregationspuffer niedriger Ionenstärke zur Aggregation gebracht zu werden. Die Aggregate wurden negativ kontrastiert.

Lösung:

Aggregationspuffer:	150 mM KCl 10 mM Histidin 2 mM MgCl ₂ 0,02 % (w/v) NaN ₃
---------------------	---

2.15 Negativ-Kontrastierung

Die durch Selbstassoziation geformten Aggregate wurde elektronenmikroskopisch über die Technik der Negativ-Kontrastierung untersucht. Hierbei werden Strukturen durch das Aufbringen von elektronendichten Schwermetall-Salzen kontrastiert, indem diese sich vorzugsweise in Vertiefungen sammeln und durch die Aussparung erhabener Strukturen eine Negativ-Replika des Objekts formen. Als Träger dienen Kupfernetzchen, auf die ein zuvor separat hergestellter Kohlefilm aufgebracht wurde. Diesen Film erzeugt man im Vakuum einer Verdampfungsanlage durch Abdampfen von Partikeln von einer Kohlelektrode auf ein Glimmerplättchen. Er kann auf einer sauberen Wasseroberfläche abgeschwemmt werden, um dann mit auf einem Drahtgitter angeordneten Netzchen "gefischt" zu werden. Um die Hydrophilie

der Kohleschicht zu gewährleisten, wurde diese möglichst unmittelbar vor der Herstellung der Präparate für kurze Zeit einer intensiven UV-Strahlung ausgesetzt, die in einer Bedampfanlage durch eine sogenannte Glimmentladung erzeugt wurde.

Ein Tropfen der zu untersuchenden Lösung wurde für ca. 30 sec auf das Netzchen gebracht das Präparat nach Abklopfen der Suspension mit einigen Tropfen Uranylacetat-Lösung unter wiederholtem Abklopfen behandelt, getrocknet und so für die Elektronenmikroskopie verwendet.

Lösung:

Uranylacetatlösung: 1% (w/v) Uranylacetat (gefiltert; 0,45µm Membran)

2.16 Elektronenmikroskopie

Die Vergrößerungsstufen der unterschiedlichen Elektronenmikroskope, die im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurden, wurden über externe Proben kalibriert. Dabei fanden kommerziell erhältliche Eichgitter sowie Aggregate von Fibrin Verwendung. Über diese Kalibrierung wurde die Grundperiode der erhaltenen Aggregate bestimmt. Diese schwankt nicht nur zwischen verschiedenen Objekten einer Präparation, sondern auch innerhalb einer bestimmten Struktur zwischen 14,0 und 14,9 nm. Da der Myosinköpfchen-Abstand in dicken Filamenten von Insektenmuskeln 14,5 nm beträgt, erscheint eine Festsetzung der prinzipiellen Periode der Aggregate auf diesen Wert gerechtfertigt. Die Berechnung aller weiteren Abstände und Perioden innerhalb einer gegebenen Struktur, welche anhand von Fourier-Transformationen (s. Kap. 2.19) vorgenommen wurde, nimmt diesen Netzebenenabstand als Bezugsgröße.

Alle zu einer quantitativen Auswertung herangezogenen Negative, die diese interne Kalibrierung nicht zulassen, d.h. Bilder von rotationsbedampften Molekülen und kristallinen Strukturen in Bakterien, wurden an einem Philips-EM 410 aufgenommen, dessen Primärvergrößerungsstufen über ein Eichgitter kalibriert worden waren.

Die Digitalisierung der Negative erfolgte durch Einscannen mit einem Laser-Densitometer der Fa. Molecular Dynamics mit einer Farbtiefe von 8 bit (d.h. 256 Graustufen) und einer Schrittweite von 50 µm. Moleküllängen rotationsbedampfter Proteinpräparationen wurden anhand so digitalisierter Negative mit Hilfe des Programms „Image Tool“ bestimmt.

2.17 Kristallisationsversuche auf Lipid-Oberflächen

Über die Kristallisation von Membranproteinen in Lipid-Doppelschichten hinaus werden Lipid-Monolayer zur Herstellung kristalliner Anordnungen von wasserlöslichen Proteinen eingesetzt (Uzgiris & Kornberg, 1983). Primäres Anliegen ist die Ausbildung 2-dimensionaler

Schichten von Proteinmolekülen auf einer hydrophilen Oberfläche, wobei auch Fälle beschrieben sind, in denen sich makroskopische 3-D-Kristalle züchten lassen, die eine solche flächige Anordnung als Nukleationskeim nutzen (Edwards *et al.*, 1994). Der entscheidende Mechanismus dieser Technik beruht darauf, dass Proteine in der Nähe der Lipid-Wasser-Grenzfläche bis zu Konzentrationen von mehreren hundert mg/ml konzentriert und vororientiert werden (Hemming *et al.*, 1995). Die an der Grenzfläche fluide dispergierten Ladungen erlauben dann eine gerichtete Anlagerung von Molekülen in zunächst zwei Dimensionen.

Gerade bei filamentösen Proteinkomplexen wie z.B. Aktin-Filamenten (Taylor & Taylor, 1992), die zu einer räumlichen Bündelung mit geringem Ordnungsgrad neigen, hat sich diese Technik als sehr effektiv erwiesen, um planare Anordnungen zu erzeugen. Von diesen Formationen ist eine verbesserte elektronenmikroskopische Zugänglichkeit zu erwarten als von 3-dimensionalen Strukturen, deren Analyse durch die variable Anzahl von Einheitszellen in der Projektion erschwert ist (Taylor & Taylor, 1999).

Stehen keine spezifischen Liganden zur Verfügung, die eine auch räumlich gerichtete Assoziation an die Grenzfläche ermöglichen, geschieht die Anlagerung über ionische Wechselwirkungen an die Ladungen der Lipide und oberflächenaktiver Substanzen wie zum Beispiel an die positive Ladung des quaternären Ammoniumions. Eine Monolayer-Schicht eines solchen (variablen) Gemisches wird an der Wasser-Luft-Grenzfläche eines Puffertropfens gespreitet. Nach erfolgter Polymerisation wird diese Schicht mitsamt den aufgelagerten Strukturen mit einem sogenannten „löchrigen“ Netzchen (Fukami & Adachi, 1965) gefischt; die Verwendung dieser Art von Netzchen trägt zur Stabilisierung der aufgelagerten Strukturen im Vergleich zu gewöhnlichen kohlebedampften Netzchen bei (Kubalek *et al.*, 1991). Die Probe wird im Anschluss noch einmal durch einen dünnen Kohlefilm stabilisiert.

2.17.1 Herstellung „löchriger“ Kohlefilme nach Fukami *et al.* (1965)

- a) Ein Objektträger wurde mit 0,03 %iger Distearyl-Dimethyl-Ammonium Chlorid-Lösung benetzt, auf 4° gekühlt und wieder nach Raumtemperatur transferiert, um feine Kondensationströpfchen zu bilden.
- b) Der Objektträger wurde in eine 0,5 %ige Lösung von Cellulose-Acetobutyrat in Ethylacetat getaucht und getrocknet.
- c) Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Plastikfilm in 0,1 M HCl-Lösung abgeschwemmt, die Kupfernetzchen (400 Maschen) darauf platziert und der gesamte Film mit Parafilm abgenommen und getrocknet.
- d) Die Netzchen wurden kohlebedampft.

Lösungen:

Distearyl-Dimethyl-Ammonium-Chlorid: 0,03 % (w/v)

Cellulose-Acetobutyrat: 0,5 % (w/v) in Ethylacetat

HCl: 0,1 M

2.17.2 Probenvorbereitung

A) Proteinlösungen:

- a) Die Proteine in Aufbewahrungspuffer (0,6 M KCl; 10 mM Imidazol pH 7,2; 0,02 % NaN_3 , Protease-Inhibitoren) wurden über centriplus® bis zu einer Proteinkonzentration von mindestens 2 mg/ml konzentriert.

B) Lipidlösungen:

- a) Zur Handhabung der Lipide und lipidlöslichen Stoffe wurde nur Glasware verwendet.
 b) Tiefgekühlte Stammlösungen wurden 1 h bei Raumtemperatur aufgetaut.
 c) Die jeweilige Mischung von Ammonium-Salz und Lipid wurde unter dem Abzug hergestellt (typischerweise 30 % (w/w) oberflächenaktive Substanz) und nochmals mit Chloroform 1:1 verdünnt.

Lösungen:

Dilauryl-Phosphatidyl-Cholin: 1 mg/ml in Chloroform

Didodecyl-Dimethyl-Ammonium-Chlorid: 1 mg/ml

C) PEG:

- a) Aus einer 10 %igen (w/v) Stammlösung von PEG (Aufbewahrung: -20°C) in Lipid-Aggregationspuffer wurde vor jedem Ansatz mit selbigem Puffer auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt.

Lösung:

Lipidaggregationspuffer: 20 mM Tris, pH 7,6
 20 mM NaCl
 1 mM EDTA
 0,02 % (v/v) β -Mercaptoethanol
 0,05 % (w/v) NaN_3

2.17.3 Kristallisationsansatz

Auf einer Teflonoberfläche wurden die Proben in Vertiefungen mit 5 mm Durchmesser und 1 mm Tiefe angesetzt.

- a) Die Kavitäten wurden mit 30 μl in Lipid-Aggregationspuffer beschickt und 1 μl Lipidlösung wird mit einer Hamilton-Spritze auf die Oberfläche aufgebracht; das Chloroform wurde in 10 min bei Raumtemperatur abgedampft.
 b) Die Kristallisation erfolgte bei 4°C im Kühlraum:
 c) 1 μl der Proteinlösung wurde mit einer Hamilton-Spritze unter die Oberfläche injiziert und der Ansatz wird zwischen 3 h bis zu mehreren Tagen inkubiert.
 d) Die Teflonplatten wurden in einer mit Parafilm abgedichteten Glaskammer aufbewahrt.

2.17.4 Probennahme

Die Monolayer wurden vorsichtig mit den Lochfolien-Netzchen vom Tropfen gefischt, mit Uranylacetat fixiert und kontrastiert und 10 min in der Kälte freihängend an der Pinzette getrocknet. Abschließend wurden die Proben mit einer Kohleschicht stabilisiert.

Lösung:

Uranylacetat : 1% (w/v)

2.17.5 Elektronenmikroskopie

Die hier präsentierten Bilder wurden an einem Philips CM 120 bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV und Primärvergrößerungen zwischen 30 000fach und 65 000fach aufgenommen.

2.18 Beugungsexperimente

Eine Vorauswahl und Charakterisierung einzelner EM-Aufnahmen wurde durch optische Beugung mit Hilfe institutsinterner Eigenkonstruktionen von Laser-Bänken vorgenommen. Die Bearbeitung und Prozessierung digitalisierter Bilder (s. Kap. 2.17) erfolgte an Beugungsbildern, die durch elektronische Fast-Fourier-Algorithmen mit der Software CRISP (Windows; Version 2.0) erstellt wurden. Lediglich das Diffraktionsmuster in Abb. 3-26 A wurde mit der Software „spectra“ an einer Unix-Station erstellt. Filterungsoperationen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit automatisierten Funktionen dieser Programme durchgeführt, die eine Definition von Einheitszellen-Dimensionen erlauben. Diese Operationen unterdrücken das Rauschen und reduzieren das Bild auf die entsprechenden, periodisch wiederkehrenden Strukturen. Wenn eine Kombination von Einzelpunkten zur Filterung herangezogen wurde, ist sowohl deren Lage als auch die Größe der entsprechenden FFT-Regionen (Pixel um das Zentrum des Beugungspunktes) als Maskengröße angegeben. Die dargestellten Dichtemuster sind ebenfalls über Programmfunktionen erstellt. Sie stellen ein gemitteltes Färbungsmuster der gewählten Einheitszelle dar und können entweder ohne Wertung (Mehrzahl der dargestellten Fälle) oder nach automatischer Bestimmung der Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Symmetrie durch das Programm dargestellt werden. Als Mittelungen unterscheiden sie sich damit grundlegend von inversen FFTs, die das gesamte Bild unter Ein- oder Ausschluss bestimmter Strukturen filtern und rekonstruieren.

2.19 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration einer Probe wurde mit dem Bradford-Test (Bradford, 1976) bestimmt. Da sich das Färbeverhalten einer gegebenen Stammlösung im Laufe der Zeit verändert, wurde zu jedem Test eine Standardkurve mit einer BSA-Lösung erstellt. Hierfür wurden in Dreifachansätzen je 100 µl einer Verdünnungsreihe zwischen 6,25 µg/ml und 200 µg/ml BSA in NaCl-Lösung sowie ein entsprechender Blindwert mit 1 ml Färbereagenz (Stammlösung 1:5) versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, und deren Extinktion bei 595 nm

photometrisch bestimmt (Abb. 2-2). Gleichzeitig wurden unterschiedliche Volumina der zu bestimmenden Proben (Bilanz zu 100 µl mit H₂O) in Doppelansätzen gegen entsprechende Pufferproben getestet. Es ist aus Abb. 2-2 zu ersehen, dass die Farbreaktion nur über einen begrenzten Bereich bis 10 µg Protein/Ansatz linear verläuft, so dass nur Ergebnisse ausgewertet wurden, die in diesen Abschnitt fielen.

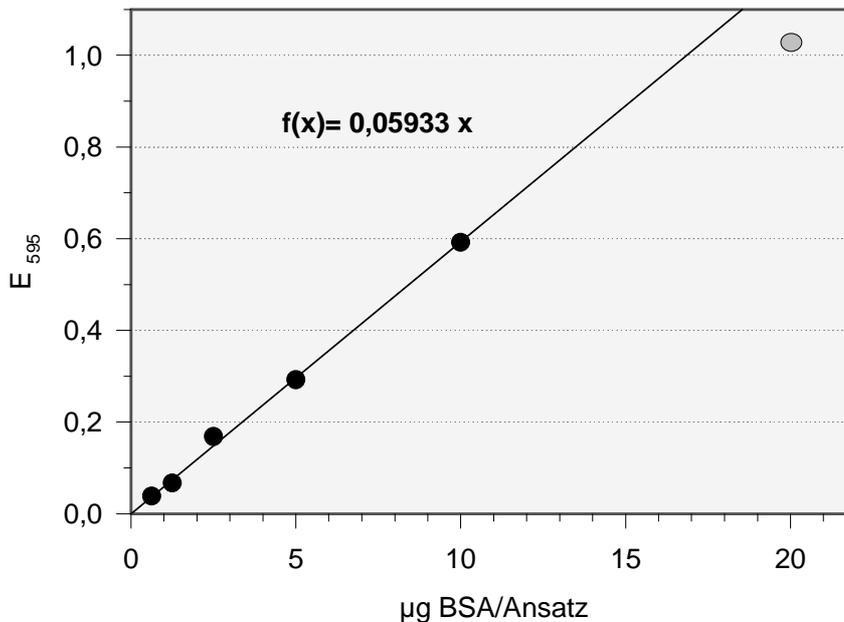


Abb. 2-2: BSA-Standardkurve zum Bradford-Test

Lösungen:

Stammlösung:	100 mg Coomassie Brilliant Blau G-250 50 ml Ethanol 95 % (v/v) 100 ml Phosphorsäure 85 % (w/v) 50 ml H ₂ O
NaCl-Lösung:	150 mM NaCl

2.20 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Charakterisierung einzelner Teilschritte der Proteinpräparationen und zur Demonstration der Reinheit isolierter Proteine wurde die diskontinuierliche Elektrophorese mit dem SDS-Puffersystem nach Lämmli verwendet (Laemmli, 1970).

2.20.1 Probenvorbereitung

Wenn keine den Gellauf störenden Komponenten wie zum Beispiel KCl in höheren Konzentrationen oder ein hoher Gehalt an Lipiden im Probenmaterial vorlagen, wurde die Proteinlösung mit zweifach konzentriertem Probenpuffer 1:1 verdünnt und 4 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Bei Anwesenheit von interferierenden Substanzen wurden die Proteine zuvor

mit TCA (72 %) in einer Endkonzentration von 10 % gefällt, indem die Probe 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, das Präzipitat in 2 min bei 10 000 g abzentrifugiert und das Pellet mit 1/10 des gewünschten Endvolumens an 0,5 M Tris-Base neutralisiert wurde. Die Proteine wurden resolubilisiert, indem sie zunächst in zweifach konzentriertem Probenpuffer bei 80°C bis zur vollständigen Auflösung des Pellets inkubiert wurden. Abschließend wurde mit H₂O das entsprechende Endvolumen eingestellt und die Probe wie oben 4 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Diese Vorgehensweise wurde auch zur Aufkonzentrierung von Proben mit sehr geringem Proteingehalt angewendet, wobei die Inkubationszeit mit TCA dann auf 10-15 min verlängert wurde. So hergestellte Gelproben können bei -20°C gelagert werden. Da hier größtenteils mit Bakterien-Lysaten und Proteinlösungen hoher KCl-Konzentration gearbeitet wurde, kam vorwiegend letzteres Verfahren zur Anwendung.

2.20.2 Gellauf

Für die Herstellung der Gellösungen wurde 4fach konzentrierter Sammel- bzw Trenngel-Puffer und eine 30 %ige Acrylamidstammllösung zu einem der gewünschten Endkonzentration entsprechenden Anteil verwendet. Es kamen Trenngele von 7,5 %, 10 % und Gradientengele von 5-15 % zum Einsatz; Sammelgele wurden 4 %ig angesetzt. Die Polymerisation wird über Zugabe des Katalysators TEMED und des Radikalkettenstarters APS (Menge je nach Volumen und Acrylamidkonzentration der Gellösung, z.B. je 30 µl für 8 ml einer 7,5 %igen Lösung) in Gang gesetzt, und gegossene Trenngele mit H₂O bis zur Auspolymerisation überschichtet. Die Gele wurden im "Minigel"- oder Großgel-Maßstab in Apparaturen der Firmen LKB oder Bio-Rad gefahren. Die Elektrophorese wurde diskontinuierlich bei konstanten Stromstärken von 10 mA und 15 mA in Sammel- bzw. Trenngel im Falle 0,75 mm dicker "Minigele" oder 25 mA und 40 mA bei Verwendung von 1,5 mm dicken Großgelen durchgeführt. Die Wanderung des im Probenpuffer enthaltenen Bromphenolblau-Farbstoffes macht den Fortschritt der Elektrophorese beobachtbar. Fixierung und Anfärbung der Proteine erfolgte mit Färbelösung für 30 min, bevor abschließend die Gelmatrix mit 7 %iger Essigsäure unter mehrfachem Wechsel entfärbt wird.

Die Trenneigenschaften der Gele wurden über Molekulargewichtsstandards der Firmen Novex (Mark12) und Sigma (HMW-, LMW-Standard) kalibriert.

Lösungen:

Fällungsreagenz:	72 % (w/v) Trichloressigsäure
Neutralisierungslösung:	0,5 M Tris-Base
2fach-Probenpuffer:	125 mM Tris-HCl
pH 6,8	4 % (w/v) SDS
	20 % (v/v) Glycerin
	0,002 % (w/v) Bromphenolblau
	200 mM Dithiothreitol (DTT)

Acrylamid-Stammlösung:	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
4fach Trenngelpuffer: pH 8,8	1,5 M Tris-HCl 0,4 % (w/v) SDS
4fach Sammelgelpuffer: pH 6,8	0,5 M Tris-Cl 0,4 % (w/v) SDS
APS-Lösung (frisch):	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
Elektrodenpuffer: pH ~8,3	25 mM Tris (untitriert) 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Färbelösung:	0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau G-250 50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärber:	7 % (v/v) Essigsäure

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit verschiedenen Vektorsystemen versucht, Fragmente des LMM aus Insektenmuskeln zur Überexpression in *E.coli* zu bringen. Dabei erweist sich das pET-System als Expressionsvektor der Wahl, um LMM-Material in großen Mengen herzustellen, bei gleichzeitiger Option einer einheitlichen Reinigungsmethode für jedweden Abschnitt des aggregationsfähigen Myosinabschnittes. Vorgestellt werden hier beispielhaft verschiedene Stadien der Vorbereitung und Manipulation der Plasmid-DNA.

In einem Pilot-Klonierungs-Ansatz war festgestellt worden, dass unter Verwendung dieses Vektors unterschiedliche Expressionsprodukte von *E.coli*-Zellen translatiert wurden (vgl. Kap.3.2). Als Ursprung dieses Effekts konnte die unterschiedliche Frequenz einzelner Codons ("codon usage") in pro- und eukaryotischen Zellen und die damit einhergehende differenzielle Expression entsprechender t-RNA-Populationen identifiziert werden. Bedingt durch vergleichsweise niedrige Level bestimmter t-RNAs kann die Translation an kritischen Stellen nicht korrekt fortschreiten; Fehlprodukte sind die Folge. Im hoch syntheseaktiven T7-System war somit ein Austausch von kritischen Codons durch Mutation unumgänglich:

Zur Mutation wird Einzelstrang-DNA benötigt, die als *template* für die Synthese des modifizierten Zweitstrangs fungiert, wobei die Mutation über entsprechende Primer eingeführt wird. Diese Einzelstrang-DNA wird mit Hilfe von Phagen hergestellt, die einen spezifischen Replikationsursprung innerhalb eines Plasmids nutzen und die einsträngigen Produkte an die Folgeneration weitergeben. Plasmide, wie pUC119, die diese Möglichkeit bieten, werden als Phagemide bezeichnet. Zur Mutation eines Tandems seltener Arginin-Codons und einer lokalen "Häufung" zweier entsprechender Codons am 3'-Ende der Sequenz wurde der für das gesamte LMM kodierende Bereich in das pUC119-Phagemid umkloniert. Abb. 3-1 A zeigt die verschiedenen Stadien der Präparation dieses 2 kB-Fragments. Das Bgl II / Eco R I-*insert* wurde in die *multiple cloning site* des Vektors unter Verwendung der BamH I (gleiche Überhangsequenz wie Bgl II) und Eco R I-Schnittstelle kloniert. Der korrekte Einbau wurde durch Restriktionsanalyse einiger Klone mit Enzymen sichergestellt, deren Schnittstellen innerhalb und außerhalb des *inserts* liegen (nicht dargestellt).

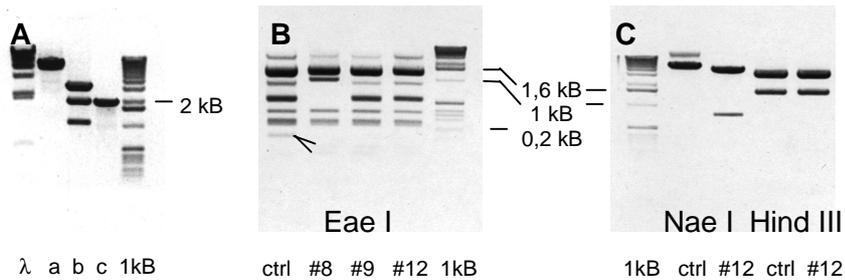


Abb. 3-1: DNA-Manipulationen: Subklonierung und Mutationsanalyse

- A:** Reinigung eines 2 Kilobasen (kB)-Fragments kodierend für die gesamte LMM-Region des embryonalen Myosins (einschließlich Exon 19): λ : Hind III-verdauter λ -DNA-Marker; a: linearisierter Vektor CD305 nach erstem Verdau mit Eco R I; b: Fragmente nach zweitem Verdau mit Bgl II; c: gereinigtes 2 kB-Fragment; 1 kB: Marker
- B:** Restriktionsanalyse verschiedener Klone des mutierten pUC-LMM-Vektors: Detektion der neu entstandenen Eae I-Schnittstelle nach Mutation seltener Codons in Exon 19: ctrl: pUC-LMM vor Mutation; verschiedene Klone, nummeriert; 1 kB: Marker. Die Markierung (Gabel) zeigt die Aufspaltung des 163 bp-Fragments; die Spaltprodukte sind schwach, v.a. bei Klon #9 zu erkennen.
- C:** Restriktionsanalyse des Klons pUCLMM # 12: Detektion der Nae I-Schnittstelle nach Mutation des Tandems seltener Codons in Exon 17 und Hind III-Verdau; ctrl: pUC-LMM vor Mutation; 1 kB: Marker

Die Produkte eines Oligonukleotid-vermittelten Mutagenese-Ansatzes sind natürlicherweise Heteroduplices von Original- und mutierter Sequenz. Eine der effizientesten Methoden zur Erhöhung der Ausbeute an positiven Klonen ist die Kunkel-Methode, die auf der Diskriminierung Uracil-haltiger Original-DNA in Wildtyp-*E.coli* beruht (Kunkel *et al.*, 1987). Das Original-Protokoll, das einen Einbau der Zielsequenz in Phagen-DNA vorsieht, kann durch Verwendung von Phagemiden vereinfacht werden. Ein in einem "Kunkel-Stamm" (Uracil-DNA-tolerant; hier RZ 1032) angezogenes Phagemid weist bei entsprechenden Kulturbedingungen einen hohen Gehalt an Uracil auf. Die Effizienz der "Uracilisierung" des hier angezogenen pUC-LMM-Phagemids (vgl. Kap. 2.4.1.2) wurde durch eine Parallel-Transformation in einen Uracil-toleranten und -diskriminierenden Stamm bestimmt, wobei die Kompetenz der Bakterien-Chargen mit Hilfe eines Vergleichsplasmides normiert wurde. Die erreichte 20fach höhere Propagierung der U-DNA im Kunkel-Stamm ist dabei ausreichend, um die derartig vorbereitete DNA in Einzelstrang-*template* (Superfektion von Helfer-Phagen: s. Kap.: 2.4.1.3) umzuwandeln und im Anschluss an die Mutagenese eine effiziente Propagierung des mutierten Stranges zu gewährleisten.

Insgesamt wurden vier seltene Codons in einem kombinierten Ansatz mit Hilfe zweier mutagener Primer umgewandelt. Dabei sind die Primer so konzipiert worden, dass bei erfolgter Punktmutation gleichzeitig eine neue Restriktionsstelle entsteht; dies erlaubt ein einfaches Restriktions-*screening*. Die Charakterisierung der resultierenden Klone vollzieht sich in drei Schritten: Nach Überprüfung der erfolgreichen Entfernung der AGG AGG-Doublette durch Nae I-*screening* werden positive Klone auf die Anwesenheit der Mutationen im Exon 19-Bereich (Eae I-*screening*; Abb. 3-1 B) getestet. Abb. 3-1 C zeigt das 474 bp-Fragment nach

Nae I-Verdau, das korrektes *priming* an der Zielsequenz nachweist. Fehl-*priming* an unspezifischen Stellen würde sich durch die Anwesenheit weiterer Fragmente bzw. von Fragmenten unvorhergesagter Größe äußern. Die Überprüfung von insgesamt 20 Klonen ergab in 8 Fällen derartige Effekte, 4 Plasmide wiesen die Nae I-Schnittstelle an der gewünschten Zielsequenz auf, während in allen übrigen Fällen keine Mutation zu detektieren war.

Die Verifizierung der Mutationen im Exon 19-Bereich ist durch das komplexere Bandenmuster bei Eae I-Verdau und die Tatsache erschwert, dass das nach erfolgter Mutation spaltbare Fragment relativ klein ist; letzteres führt zu sehr schwachen Banden. Die Eae I-Analyse dreier der oben erwähnten Nae I-positiven Klone ist in Abb. 3-1 B dargestellt. Die Spaltprodukte von 71 und 92 Basenpaaren sind speziell im Falle des Klons #12, der letztendlich für die Sequenzierung und alle nachfolgenden Schritte verwendet wurde, erwartungsgemäß recht schwach zu erkennen; im Original sind diese zweifelsfrei auszumachen. Zwei Klone mit den Bezeichnungen pUCLMM-4A # 9 und 12 waren für beide Mutationen mit den Vorhersagen entsprechenden Bandenmustern positiv.

Die Übereinstimmung der Sequenz des Klons #12 mit der von George *et al.* (1989) publizierten wurde durch Sequenzierung überprüft. Ausschnitte der Sequenziergele, aus denen die beschriebenen Mutationen von Arginin-Codons abzulesen sind, sind in Abb. 3-4 A und B dargestellt. Das AGG AGG-Tandem wurde erfolgreich zu CGC CGG gewandelt, die AGG bzw. AGA-Codons im Exon 19 zu CGG respektive CGA.

Dieses Plasmid wurde nunmehr als *template* für die PCR-Amplifikation definierter Abschnitte der Insekten-LMM-Sequenz eingesetzt. Bedingt durch die vorgegebenen Hybridisierungssequenzen und die Klonierungsstrategie steht für das Primer-Design bei dieser Art der Anwendung kaum Raum zur Manipulation zur Verfügung. Daher muss die Amplifizierungsreaktion in Bezug auf Ausbeute und Reinheit über die PCR-Bedingungen optimiert werden. Diese Optimierung ist in Kap. 2.1.3 beschrieben. Die Aufarbeitung der Produkte für die spezielle Klonierungsweise in den pET-Vektor involviert 2 Reinigungsschritte, nämlich die präparative Gelelektrophorese des gesamten PCR-Ansatzes und die DNA-Isolierung aus dem BamH I-Verdau der *downstream* gelegenen Klonierungsstelle. Im Ergebnis erhält man unter den hier verwendeten Bedingungen reine *inserts* (Abb. 3-2) in Quantitäten von 400 bis 600 ng Gesamt-DNA. Die Ausbeute ist dabei von der Rate an Fehl-*priming* bei einer gegebenen Hybridisierungs-(*annealing*-) Temperatur abhängig. Sie ist also insofern fragmentspezifisch, als die Anwesenheit homologer Sequenzen bei einer bestimmten *annealing*-Temperatur die Spezifität der Hybridisierung beeinflusst. In Abb. 3-2 sind jeweils gleiche Mengen der unterschiedlichen *insert*-Präparationen aufgetragen. Die drei kleinsten Fragmente wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die korrekte Größe der Fragmente von ca. 600 bp, 1200 bp und 1800 bp lässt sich durch Vergleich mit dem Marker nachvollziehen. Da alle Proben in gleicher Weise aus dem PCR-Ansatz aufgearbeitet wurden, lässt sich hier

auch ein Umstand ablesen, der schon indirekt bei der Beschreibung der Optimierung der Versuchsbedingungen angeklungen war: Für das Fragment 3-19 ist die geringste Ausbeute zu verzeichnen; dies ist die Folge der vergleichsweise hohen Fehl-*priming*-Frequenz des *upstream*-Primers für dieses Fragment.

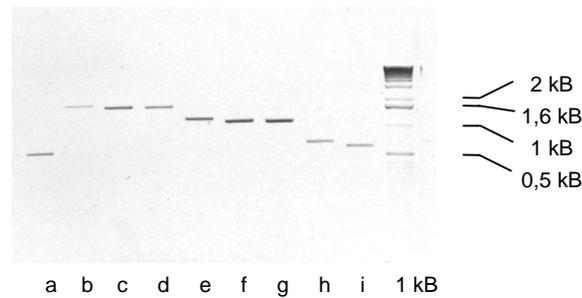


Abb. 3-2: Gereinigte und geschnittene PCR-Produkte für alle Fragmente: einsatzbereite *inserts*;

Auftrag: entspricht 1/5 des ursprünglichen PCR-Ansatzes von 100 μ l.

a: *insert* "1"; b: *insert* "3-19"; c: *insert* "3-18"; d: *insert* "3-1"; e: *insert* "2-19"; f: *insert* "2-18"; g: *insert* "2-1"; h: *insert* "1-19"; i: *insert* "1-18"; 1 kB: DNA-Marker

Nach ersten Erfahrungen mit der Klonierung von *inserts*, die eine Ligation stumpfer Enden beinhaltet, war festgestellt worden, dass der üblicherweise verwendete leichte molare Überschuss von *insert* gegenüber dem Vektor in einer relativ geringen Ausbeute an positiven Klonen resultiert. Daher wurde für die Ligationen in den pET-Vektor ein möglichst hohes molares Verhältnis *insert*:Vektor zwischen 6:1 bis zu 30:1 eingesetzt. Dies zahlte sich insofern aus, als in allen Fällen (bei einer Gesamtzahl von 63 getesteten Plasmiden für 9 verschiedene Fragmente) eine Rate positiv getesteter Klone von mindestens 50 % pro Fragment erzielt werden konnte. Im Durchschnitt trugen $\frac{2}{3}$ der Klone das *insert* in korrekter Orientierung mit vollständig wiederhergestellten Restriktionsstellen für Nde I und BamH I (Abb. 3-3 A). Das Gel zeigt freigesetzte *inserts* für die Fragmente 3-19 und 3-18 in der korrekten Größe von ca. 1,8 kB.

Bei Verwendung verschiedener Restriktionsstellen zur Klonierung sind prinzipiell ungerade Vielfache von *inserts* möglich, jedoch sehr unwahrscheinlich, wenn es sich wie hier einseitig um eine "blunt end"-Fusion (Ligation stumpfer Enden) handelt. Multipler Einbau würde sich in einer überproportionalen Bandenintensität des *inserts* äußern und wurde in keinem Fall beobachtet. Es konnte im recht weiten Bereich molarer Verhältnisse (*insert*:Vektor) keine eindeutige Abhängigkeit zur Zahl positiver Klone festgestellt werden, jedoch rangierten Quotienten von 6:1 bis 10:1 am unteren Ende von 50 % der Ausbeute-Skala. Die kleineren *inserts* wurden deutlich effektiver eingebaut, was auf den geringeren Freiheitsgrad der Bewegung nach Hybridisierung der ersten Schnittstelle zurückzuführen sein dürfte.

Ein Initial-*screening* mit dem unabhängig von den Klonierungsstellen schneidenden Enzym Hind III (vgl. Abb. 3-1 C; entspricht der Gesamtfraktion *insert*-tragender Plasmide) erlaubt durch den Vergleich mit dem Nde I-Bam HI-Verdau eine Aussage über den Anteil an Hybriden, bei denen die Schnittstellen nicht korrekt wiederhergestellt sind: in 12,5 % aller Fälle führte die Ligation zu fehlerhafter Basenabfolge an einer der beiden Klonierungsstellen (Abb. 3-3 A a und d), mit hoher Wahrscheinlichkeit am Nde I-Ende.

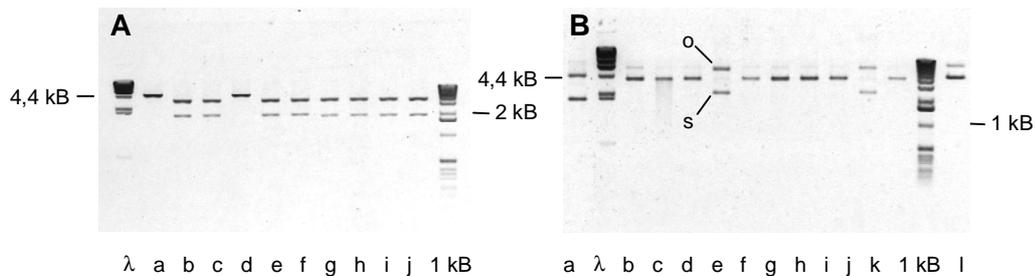


Abb. 3-3: Restriktions-Screening

A: Expressionsplasmide:

Nde I-BamH I-Doppelverdau von Klonen nach Transformation eines Ligationsansatzes; Einsatz: 100 ng Plasmid; λ, 1 kB: DNA-Marker; a-f: Klone 3-19 # 1-6; g-j: Klone 3-18 # 2-5

B: Serin->Glutamat-Mutation am Beispiel 1-19->1-19G:

Aat II- Verdau von Klonen nach Transformation eines *in vitro*-Mutagenese-Ansatzes; Einsatz: 100 ng Plasmid; λ, 1 kB: DNA-Marker; a: Negativ-Kontrolle: pET-Vektor; b-k: Klone 1-19G # 1-10; l: Positiv-Kontrolle: Klon 1-19 # 4; o: ringförmige Plasmid-Form; s: *supercoil* Plasmid-Form

An den so für die Expression einsatzbereiten Vektoren, die das Exon 19 beinhalten, wurde in einem letzten Mutationsschritt ein Austausch eines Serin- gegen ein Glutamat-Codon vorgenommen. Da es sich bei den pET-Vektoren ebenfalls um Phagemide handelt, ist dies nach demselben Prinzip wie der Arginin-Codon-Austausch durchführbar. Es wurde also grundsätzlich in gleicher Weise vorgegangen. Die geringeren Ausbeuten an ss-DNA im Vergleich zu den Präparationen des pUC-Derivats wurden durch Aufarbeitung von entsprechend größeren Kulturmengen kompensiert. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Mutationen war es hier nicht möglich, einen "Positiv"-Restriktionstest einzuführen. Jedoch verschwindet bei erfolgter Mutation eine Schnittstelle für das Enzym Aat II, für das dann weder im *insert* noch im Vektor eine Zielsequenz vorhanden ist, d.h. mutierte Plasmide können nicht mehr mit diesem Enzym linearisiert werden. Allerdings können Fehl-*primings*, die im oben beschriebenen Fall zu zusätzlichen Schnittstellen (und damit Fragmenten) führen, mit diesem *screening*-Test nicht detektiert werden. Ein Fehl-*priming* ist zwar vergleichsweise unwahrscheinlich, da der betreffende Bereich sich außerhalb der stärker homologen repetitiven LMM-Sequenzen in einer für einen „random coil“ (zufällige Sekundärstruktur) kodierenden Domäne befindet. Trotzdem wurde zur zusätzlichen Absicherung das Primer:*template*-Verhältnis in diesen Ansätzen von 20:1 auf 3:1 reduziert, um die Wahrscheinlichkeit einer

unspezifischen Hybridisierung des mutagenen Primers weiter zu vermindern. Abb. 3-3 B zeigt die Restriktionsanalyse von Klonen aus einem Ansatz zur Mutation des Fragments 1-19. Positive Klone (Abb. 3-3 B e und j) weisen ein für nicht linearisierte Plasmide typisches Wanderungsverhalten auf, das dem der Negativ-Kontrolle entspricht (diese zeigt wegen des fehlenden *inserts* eine geringere Größe). Dabei hat ein ringförmiges Plasmid eine im Vergleich zur linearisierten Form geringere Mobilität, die "supercoil"-Form (überspiralisiert) der DNA eine höhere. Deutlich zu erkennen ist ein geringer Anteil von ringförmigem Plasmid auch in der Positiv-Kontrolle (Abb. 3-3 B l), was anzeigt, dass der Verdau nicht vollständig abgeschlossen ist. Ein unvollständiger Schnitt kann zu einem sogenannten "nick" (einseitige Spaltung der Phosphodiesterbrücke) führen, was das *supercoiling* der DNA auflöst.

Mit diesem Test stellten sich für das Fragment 3-19G vier von zwölf untersuchten Klonen als positiv heraus, für 2-19G entsprechend zwei von zwölf und für 1-19G zwei von zehn Klonen. Alle zur Expression eingesetzten Plasmide wurden abschließend sequenziert. Die zuletzt beschriebene Mutation ist in Abb. 3-4 C dargestellt.

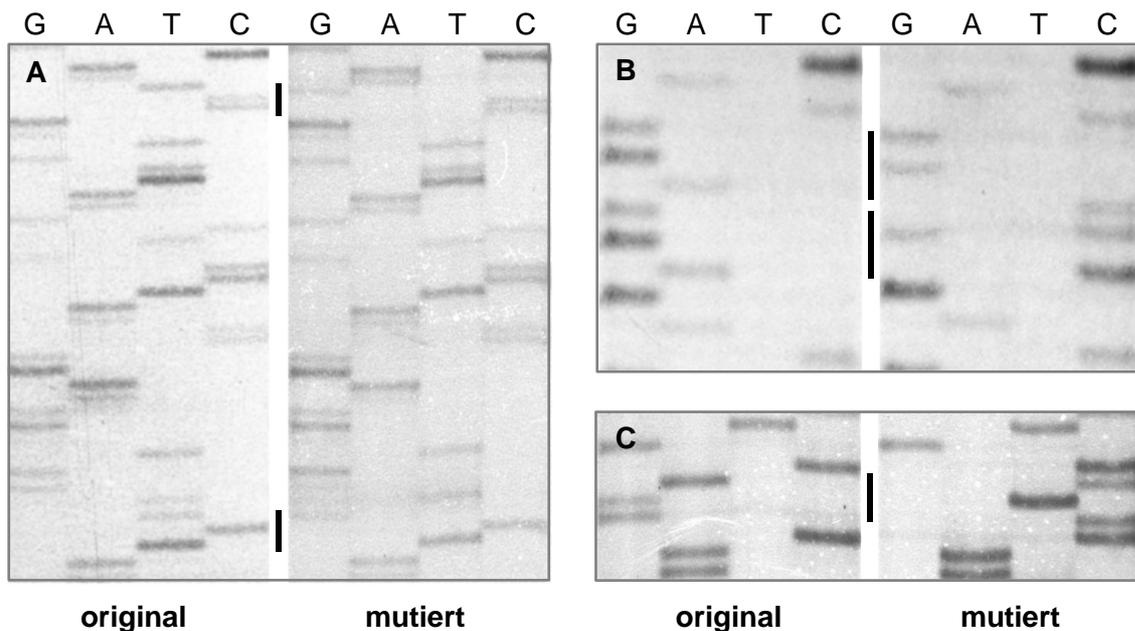


Abb. 3-4: Sequenzierung der Mutationen: Autoradiographien der ³⁵S-Sequenziergele; Leserichtung vom Primer aus: unten nach oben; Balken=Triplets

A: Mutation zweier seltener Codons im Exon 19 (antisense-Primer):

oben: CCT => CCG ; sense: AGG => CGG (Arg => Arg)

unten: TCT => TCG ; sense: AGA => CGA (Arg => Arg)

B: Mutation der Doublette zweier seltener Codons im Exon 17 (sense-Primer):

AGG AGG => CGC CGG (Arg-Arg => Arg-Arg)

C: Serin-Glutamat-Mutation im Exon 19 (antisense-Primer)

GGA => CTC ; sense: TCC => GAG (Ser => Glu)

3.2 Expression

Die rekombinante Herstellung von LMM-Fragmente in möglichst unveränderter Form wurde über unterschiedliche Vektorsysteme versucht. Die Notwendigkeit, verschiedene Expressionsvektoren einzusetzen, hatte sich aus dem Umstand ergeben, dass einzelne Fragmente durch die üblicherweise zur Prozessierung von Fusionsproteinen verwendeten Proteasen unspezifisch degradiert wurden. Weder für die Kollagenase noch für den Blutgerinnungsfaktor Xa konnte durch Variation von Enzym:Substrat-Verhältnissen und Pufferbedingungen eine ausschließliche Spezifität für die Zielsequenz erreicht werden.

Im Falle der Enterokinase-Behandlung konnten zwar die Verdauungsbedingungen so optimiert werden, dass reine Endprodukte korrekter Größe entstanden, jedoch war die Ausbeute (getestet für das Fragment 3-19) sehr gering. Wegen hoher Verluste durch Präzipitation unter Niedrigsalz-Bedingungen (10 mM Imidazol pH 6,5; 0,2 mM CaCl₂, 0,02 % NaN₃), sowie nicht gespaltenes Fusionsprotein wurden die Arbeiten mit diesem System eingestellt.

Ein Plasmid, das auf die Expression von Fusionsproteinen mit hoher Translationseffizienz ohne Einsatz von Proteasen spezialisiert ist, ist der pET-Vektor (Studier *et al.*, 1990; Studier & Moffatt, 1986). Er erlaubt die Herstellung großer Mengen an Protein durch das unabhängig von der Transkriptionsaktivität des Wirtsorganismus ablaufende T7-Promotor-Polymerase-System. Allerdings verbleiben, will man die Möglichkeit einer Affinitätsreinigung für alle zu exprimierenden Fragmente nicht verlieren, zusätzliche Aminosäuren am Endprodukt. So nutzt dieses System das kleinste bekannte Affinitäts-*tag*, das aus 6 Histidin-Resten besteht, die an teilchelatierten Nickelionen kokomplexieren können. Es werden für spezielle Anforderungen an die Expression eine ganze Palette von geringfügig unterschiedlichen Vektoren angeboten (Fa. Novagen), von denen hier ein Phagemid mit der Bezeichnung pET 23a(+) eingesetzt wurde, das das Histidin-*tag* C-terminal kodiert. Aus theoretischen Überlegungen sollten sich etwaige Überhangsequenzen am N-Terminus der LMM-Fragmente befinden; es wurde jedoch dieser Vektor eingesetzt, da unter Verwendung des entsprechenden pET-Vektors noch zusätzliche Aminosäuren (hervorgerufen durch die *multiple cloning site*) inseriert würden. Das Histidin-*tag* sowie das Stop-Codon, das ein Durchlesen in Richtung der vektoreigenen Histidinabfolge verhindert, wurden somit in den *upstream* bzw. *downstream*-Primer eingebaut.

Erste Expressionsversuche mit dem pET-Vektor brachten ein zunächst überraschendes Ergebnis: Auch hier wurde eine Reihe von Produkten erhalten (Abb. 3-5 A). Die Abbildung zeigt den Induktionsverlauf für die Expression des Fragments 3-18 anhand von Lysatproben. Deutlich zu erkennen ist der kontinuierliche Anstieg des Levels einer Kombination aus mehreren Proteinbanden bis zu einer Induktionszeit von 4,5 h, bevor diese nach Übernachtkultur wieder verschwinden. Kann man bis zum Zeitpunkt $t = 4,5$ h noch nicht ausschließen, dass es sich möglicherweise um eine parallele Akkumulation von Ziel- und Wirtsproteinen

handelt (die Kultur wird in der exponentiellen Wachstumsphase induziert), so ist das Verschwinden in ausgedehnter Kultur schon ein deutliches Zeichen dafür, dass es sich um Produkte des klonierten Genabschnitts handelt. Wird der Selektionsmarker Ampicillin im Laufe der Kultur durch β -Laktamase-Aktivität aufgebraucht, so werden Kulturen sukzessive von nicht Plasmid-tragenden Zellen überwachsen.

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten multipler Expressionsprodukte ist ein intrazellulärer proteolytischer Abbau. Da schon einige Erfahrung mit der Expression dieser Proteine in *E.coli* gesammelt, ein derartiger oder vergleichbarer Effekt jedoch nicht beobachtet worden war, konnte diese Möglichkeit als unwahrscheinlich eingestuft werden. Auch ist nicht vollständig auszuschließen, dass die Translation in unspezifischer Weise an internen Stellen initiiert wurde, da erstmalig mit einer *E.coli*-fremden Polymerase-Vektor-Kombination gearbeitet worden war. Auch diese Möglichkeit scheint aufgrund der großen Molekulargewichtsunterschiede sehr unwahrscheinlich, und würde darüber hinaus zum Verlust des Histidintags führen. Sowohl unspezifische Initiation als auch N-terminale Proteolyse ließen sich durch Aufreinigung des Fragments (Abb. 3-5 B) und damit den Nachweis der Anwesenheit des tags ausschließen.

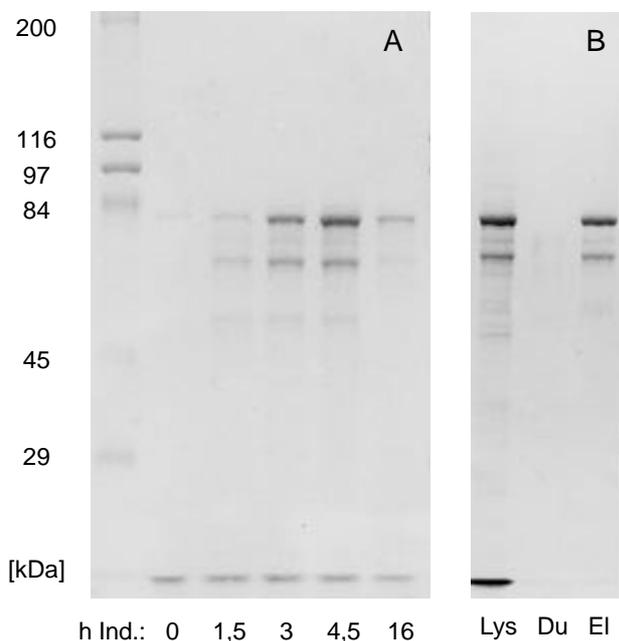


Abb. 3-5: Expression von 3-18 vor Mutation seltener Codons; 7,5 % SDS-Maxi-Gele

A: Zeitverlauf der Expression des Fragments 3-18

Lysatproben, Auftrag entspricht einem Kulturvolumen von 20 μ l; Stunden nach Induktion

B: Nickel-Affinitäts-Reinigung des Fragments 3-18

Lys: Lysat nach 4 Stunden Induktion; Du: Durchlauf der Säule; El: Eluat der Säule

Abb. 3-5 B zeigt Proben der Affinitätschromatographischen Aufarbeitung des Fragments 3-18. Die Stadien der Präparation zeigen das Triplett-Bandenmuster aus zwei stärkeren Banden, die eine schwächere einrahmen. Die Tatsache, dass sämtliche auch im Lysat prominente Banden an die Affinitätssäule binden (vgl. Lysat- und Eluat-Proben) zeigt nicht nur, dass es sich tatsächlich um Plasmid-kodierte Proteine handelt, sondern auch, dass deren Histidin-Cluster intakt ist. N-terminale Proteolyse konnte also als Möglichkeit ausgeschlossen werden.

Es mussten nun also Schwierigkeiten bei der Translation als Ursache für das Auftreten mehrerer Produkte in Betracht gezogen werden. Eine bekannte Komplikation bei der heterologen Expression ist die differentielle Nutzung einzelner Codons für Arginin in pro- und eukaryotischen Zellen. Sie kann dazu führen, dass der entsprechende t-RNA-Mangel an kritischen Stellen - insbesondere bei Auftreten einer Doublette (Tandem) seltener Codons - Fehltranslationen verursacht. Neben einem möglichen kompletten Abbruch kommt es dabei zu Verschiebungen des Leserasters (Gursky & Bibilashvili, 1994), indem ein oder zwei Nukleotide übersprungen werden („frameshift“). Eine Tandem-Wiederholung des seltenen AGG-Codons ist bei Nukleotid# 19599-19604 der Sequenz nach George *et al.* (1989) lokalisiert. Der Effekt eines *frameshifts* auf die Kettenlänge des Fragments 3-18 (Auftreten von Stopp-Codons) lässt sich leicht simulieren. Die hier (Abb. 3-5 B) zu beobachtenden Molekulargewichtsunterschiede von 11 und 6 kDa entsprechen in sehr guter Näherung den Vorhersagen (10,5 und 6,6 kDa) unter der Annahme von Leseraster-Verschiebungen am kritischen zweiten Codon der Doublette um 1 Nukleotid (unterste Bande des Triplets) bzw. 2 Nukleotide (mittlere, schwächere Bande) und Originalraster (obere Bande).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden die in Kapitel 2.4.1 beschriebenen stillen (ohne Veränderung der Aminosäuresequenz) Punktmutationen an der Originalsequenz vorgenommen.

3.3 Charakterisierung der LMM-Fragmente

3.3.1 SDS-PAGE

Schon die ersten Klonierungsversuche demonstrierten die erstaunliche Effizienz des pET-Systems bei der Überexpression von LMM-Fragmenten (Abb. 3-5). Das Auftreten aberranter Translationsprodukte konnte schließlich durch Entfernung des Tandems seltener Arginin-Codons über gezielte Mutagenese unterbunden werden. Die Lysatproben von Testkulturen in Abb. 3-6 belegen den hohen intrazellulären Level an exprimierten Proteinen, hier sogar vor einem vergleichsweise erhöhten Hintergrund an *E.coli*-eigenen Proteinen. Mit Ausnahme der Fragmente 2-18 (40 %) und 3-1 (46 %) liegen in diesen Proben die Anteile am Gesamtprote-

in bei einheitlichen 55 %. Dies ist ein Wert, der schon weit über oder an der oberen Grenze des für käufliche Fusionsproteinvektoren angegebenen liegt. Dabei entfallen niedrigere Ausbeuten auf Fragmente, die in pLysE-Zellen exprimiert wurden. Dieser Effekt ist aufgrund der durch hohe Lysozym-Konzentrationen herabgesetzten Transkriptionsaktivität (Inhibition der T7-Polymerase) zu erwarten. Zur Bestimmung der Anteile am Gesamtprotein wurden die beiden Banden um 15 –18 kDa ausgeschlossen: Es handelt sich hierbei um die nicht zelleigenen Lysozyme, nämlich jenes bei der Aufarbeitung der Zellen zugegebene aus Hühnereiweiß (untere Bande hoher Konzentration) und das pLys-kodierte T7-Enzym höheren Molekulargewichts. Die Zuordnung der letzteren Bande gründet sich auf den Vergleich von BL21-pLysS- bzw. BL21-pLysE-Transformanten (3-1, 2-18, 2-1). Deutlich ist die promotorbedingt verstärkte Expression von Vektor-kodiertem Lysozym in pLysE-Zellen nachzuvollziehen.

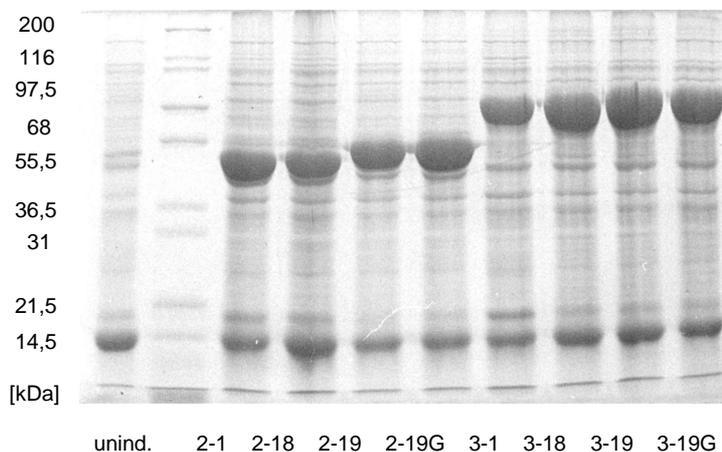


Abb. 3-6: Lysatproben von 5 ml-Kulturen aller Fragmente nach 3,5 h Induktion; 5-15% SDS-PAGE

Auftrag: ein einem Kulturvolumen von 50 μ l entsprechendes Aliquot

Uninduzierte Probe: aus 2-18-Kultur

Der Vergleich mit den Lysat-Proben in Abb. 3-7 A, in der Stadien der Aufarbeitung zweier Fragmente dargestellt sind, zeigt, dass sich diese hohen Expressionslevel durch optimale Kulturbedingungen bis hin zu Gesamtprotein-Anteilen von über 90 % in präparativen Kulturen steigern lassen. Als besonders kritisch stellte sich dabei das zur Animpfung der Hauptkultur verwendete Aliquot der Übernacht-Vorkultur heraus, das 0,5 % (v/v) nicht überschreiten sollte, um den Anteil der Nicht-Plasmid-Träger in der Hauptkultur zu minimieren. Die hier erzielten Effizienzen sind auf die Natur der produzierten Fragmente zurückzuführen, die unter zellulären Bedingungen in aggregierter Form vorliegen und als solches Koagulat nur begrenzt mit dem Wirtsmetabolismus interferieren. Dieser Umstand vereinfacht nicht nur die Reinigung der Fragmente, sondern lässt sich in weit über die präparativen Vorteile hinausgehender Weise auch analytisch nutzen (s. Kap. 3.4).

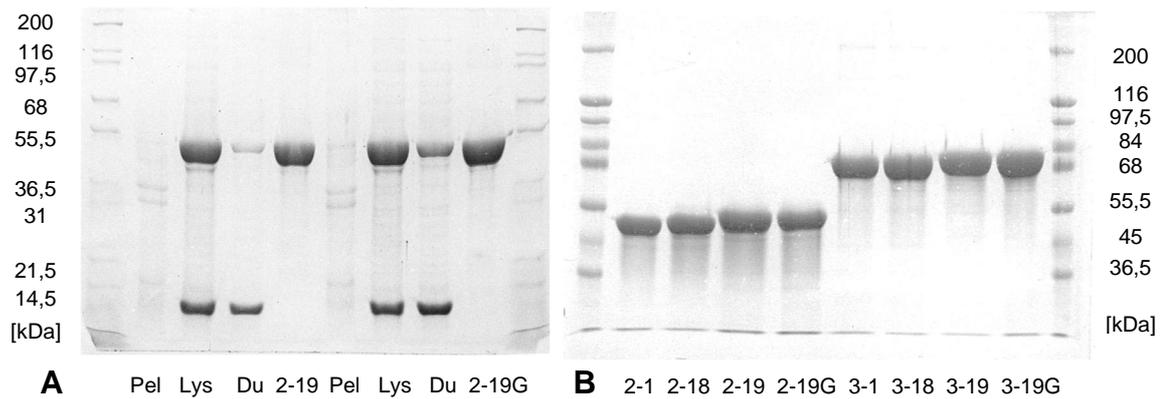


Abb. 3-7: Reinigung der Fragmente

A: Reinigung von 2-19 und 2-19G; 5-15% SDS-PAGE

Pel: Zelldebris nach Lyse: Pellet nach Ultrazentrifugation; Lys: Lysat (entsprechend 50 μ l Kultur); Du: Durchlauf der Ni-NTA-Agarose; je 5 μ g der gereinigten Fragmente 2-19 und 2-19G

B: Gereinigte Fragmente; 7,5% SDS-PAGE

Auftrag: 5 μ g des jeweiligen Proteins

Da diese Unlöslichkeit im Cytosol der Bakterien zumindest für den Großteil der untersuchten Fragmente vorausgesetzt werden konnte, war die Resolubilisierung der Proteine ein kritischer Schritt bei der Herstellung und Aufarbeitung des Lysats. Der Vergleich mit den Pellet-Proben in Abb. 3-7 A zeigt, dass die gewählten Pufferbedingungen ein vollständiges Auflösen der Aggregate gewährleisten (vgl. *Pel*- und *Lys*-Proben). In den Durchläufen der Säulen sind neben dem Lysozym bei ca. 15 kDa in unterschiedlichem Maße auch Zielproteine (hier bei 52 kDa) auszumachen. Die Anwesenheit nicht gebundenen Zielproteins korreliert dabei mit der Anzahl der Wiederbenutzungen der jeweiligen Säule. Will man Verluste an dieser Stelle vermeiden, sollte also frische Matrix eingesetzt werden. Da aber durchweg mehrere Milligramm Protein aus 100 ml Kultur gereinigt werden konnten, stellt die Ausbeute unter den gegebenen Bedingungen keinen limitierenden Faktor dar. Im Schnitt konnten ca. 5 mg Protein gewonnen werden. Erwartungsgemäß tendierten die Ausbeuten an kleineren Fragmenten (2-x) zu eher niedrigeren Gesamtmengen (3-4 mg), während von den 3-x-Fragmenten bis zu 7 mg gewonnen wurden. Die stark überladenen Proben gereinigter Fragmente in Abb. 3-7 A demonstrieren die Reinheit der Präparationen.

Abb. 3-7 B zeigt Präparationen aller hergestellten Fragmente. Anschaulich können hier auch die sehr kleinen Molekulargewichtsunterschiede beobachtet werden, die in Tab. 3-1 als apparente Molekulargewichte zusammengestellt und den theoretischen Werten gegenübergestellt sind. Hier ist im Gegensatz zu den Proben in Abb. 3-7 A ein geringfügiger Abbau der kleineren Fragment-Proben auszumachen.

Tab.: 3-1: Molekulargewichte der einzelnen Fragmente

Fragment	3-19	3-18	3-1	2-19	2-18	2-1
kalkul. MW [kDa]	70,7	67,7	67,2	48,4	45,4	44,9
appar. MW [kDa]	81,5	78,2	77,2	52,4	49,8	49,0

3.3.2 Rotationsbedampfung

Die Ultrastruktur der Moleküle wurde mit Hilfe der Rotationsbedampfung untersucht. Diese Methode erlaubt die Visualisierung von Einzelmolekülen als reliefartige Darstellung der Konturen durch Aufdampfen eines Nebels von Schwermetallpartikeln.

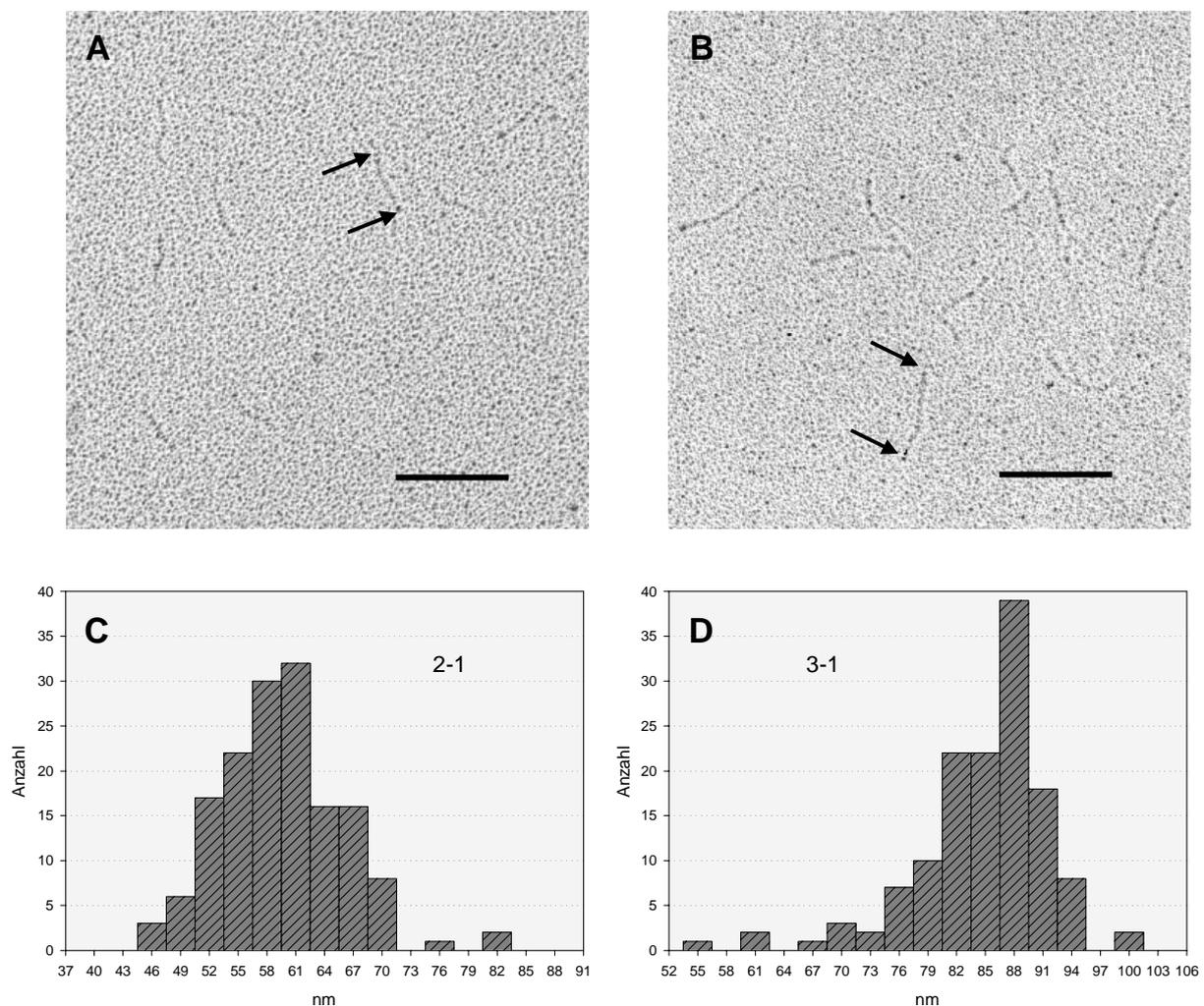


Abb. 3-8: Rotationsbedampfungen der Fragmente 2-1 und 3-1

A: Feld von 2-1-Molekülen; Balken= 100 nm; Pfeile markieren Molekülenden

B: Feld von 3-1-Molekülen; Balken = 100 nm; Pfeile markieren Molekülenden

C: Längenverteilung der Messungen an 2-1-Molekülen (n=153)

D: Längenverteilung der Messungen an 3-1-Molekülen (n=137)

Dabei ist das Auflösungsvermögen durch die Größe dieser Schwermetallkörnung (durchschnittlich 2 nm) begrenzt, was für die coiled-coil Proteine bedeutet, dass der Durchmesser der stabförmigen Moleküle über diese Technik nicht zu bestimmen ist. Hingegen lässt sich die Länge der Moleküle, eine zentrale Größe für die Ultrastruktur α -helikaler Proteine, gut bestimmen. Die Abbildungen 3-8 A und B zeigen stellvertretend das elektronenoptische Erscheinungsbild kurzer und langer Moleküle: Vor homogenem Hintergrund heben sich die Umrisse der Moleküle ab. Dabei fällt auf, dass es sich auch bei den recht kurzen Molekülen nicht um rigide Stäbe, sondern durchaus um flexible Strukturen handelt. Die Längenverteilungen zeigen typische Gauß-Verteilungen mit wenigen Ausreißern (Abb. 3-8 C und D). Tabelle 3-2 fasst die Ergebnisse der Längenmessungen für alle Fragmente zusammen.

Tab. 3-2: Moleküllängen und Kenngrößen der einzelnen Fragmente

Fragment	3-19G	3-19	3-18	3-1	2-19G	2-19	2-18	2-1
Länge [nm]	88,3	87,9	85,3	84,8	61,8	59,9	58,8	59,6
σ	10,3	6,9	6,5	6,8	7,5	6,8	7,8	6,3
n	154	107	160	137	137	142	137	153
nm/ASe	0,143	0,143	0,144	0,145	0,147	0,142	0,149	0,153

3.3.3 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Eine relativ einfache und schnelle Methode zur vergleichenden Analyse der Konformation und strukturellen Integrität der α -helikalen Proteine stellt die CD-Spektroskopie dar.

Rechtshändig α -helikale Peptide liefern ein spezifisches CD-Profil, dessen positive wie negative "Banden-Maxima" um charakteristische Wellenlängen von 192 (positiv), 207 (negativ) und 222 nm (negativ) fokussiert sind. Dabei rühren die beiden erstgenannten Maxima vom $\pi \rightarrow \pi^*$ - Elektronenübergang der Carbonylgruppe her. Das zur Charakterisierung der helikalen Konformation heranzuziehende Maximum bei 222 nm geht auf einen $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang zurück. Besonders geeignet sind diese Messungen zur Beurteilung von stabilen und uniformen Strukturen, wie dies für LMM angenommen werden konnte.

Tabelle 3-3 stellt die 222 nm-Kenngrößen dieser Messungen zusammen:

Tab. 3-3: MRE-Werte bei 222 nm der einzelnen Fragmente

Fragment	3-19G	3-19	3-18	3-1	2-19G	2-19	2-18	2-1
MRE _{222nm}	-24041	-21196	-23799	-25266	-17208	-17714	-15910	-21784

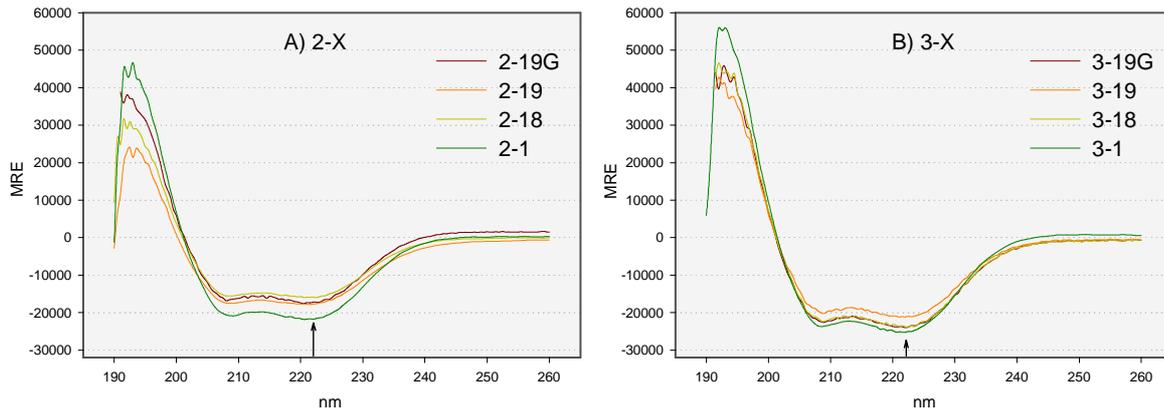


Abb. 3-9: CD-Spektren der einzelnen Fragmente; Auftrag der "Molar Residue Ellipticity"; Pfeile markieren das Minimum bei 222 nm

Abb. 3-9 zeigt die entsprechenden CD-Spektren von 5fach gemittelten Einzelmessungen für die im Rahmen der Arbeit untersuchten Fragmente.

Alle Proteine zeigen das für α -helikale Proteine typische Profil; die graphisch bestimmten Maxima sind bei Wellenlängen von 193, 208 und 222 nm zentriert. Gerätebedingt sind die Spektren im sehr kurzwelligen Bereich um das erste Maximum verzerrt.

Für zwei Proteine wurden mit unterschiedlichen Präparationen unabhängige Messungen durchgeführt, um die Zuverlässigkeit der Methode zu testen. Dabei ergibt sich für das Fragment 3-19 G ein MRE_{222nm} -Mittelwert von -24300 ($\sigma=2300$; $n=6$) und für das Fragment 3-19 einer von -23250 ($\sigma=2300$; $n=4$). Die Variationskoeffizient der Messungen beträgt somit ca. 10 %, ein in dieser Größenordnung zu erwartender Wert. Es fällt auf, dass sich die 222 nm-Messpunkte der kleineren Fragmente (2-x) relativ deutlich, d.h. jenseits der 10 %-Grenze von denen der größeren Fragmente (3-x) unterscheiden. Da der MRE-Wert Aminosäure-bezogen berechnet wird, sind die entsprechenden Kenngrößen direkt miteinander vergleichbar. Betrachtet man die Gesamtheit der kleineren Fragmente als von den längeren unabhängige Gruppe, so deuten diese Messungen einen Unterschied im Elliptizitätssignal unter den gegebenen Bedingungen an. Vergleicht man die in Tab. 3-3 zusammengefassten Messwerte entsprechend, so ergibt sich im t-Test eine hinreichend ($P<0,05$) geringe Gleichheitswahrscheinlichkeit für die beiden Gruppen 2-x und 3-x.

Den Lösungen, in denen die Aggregationseigenschaften der exprimierten Fragmente, also Selbstassoziation und Wechselwirkungen mit akzessorischen Proteinen, untersucht wurden, waren aus theoretischen Erwägungen standardmäßig Magnesium-Ionen in millimolaren Konzentrationen zugefügt worden. Durch ein an dieser Stelle sehr einfach durchzuführendes Experiment sollte mit Hilfe der CD-Spektroskopie an einem Fragment (3-19) beispielhaft ein möglicher Einfluss divalenter Kationen auf die Struktur getestet werden. Eine Veränderung der coiled-coil-Struktur oder -Geometrie könnte einen Effekt auf die Ausbildung geordneter

Strukturen haben. Ein an dieser Stichprobe durchgeführter Versuch brachte einen überraschenden Effekt zutage, der jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden konnte: Die Zugabe von Magnesium-Ionen verändert das CD-Signal im Vergleich zur Kontrolle nicht, hingegen hat Kalzium einen drastischen Effekt. Diese Messungen sind in Abb. 3-10 dargestellt.

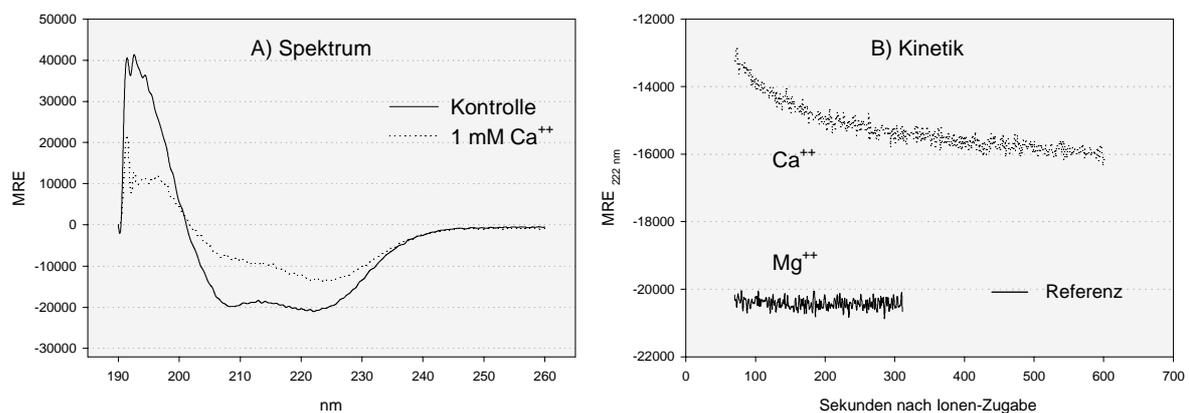


Abb. 3-10: Veränderung des CD-Signals für das Fragment 3-19 durch Kalzium-Ionen

A: CD-Spektren in Gegenwart und Abwesenheit von 1 mM CaCl_2

B: Zeitabhängige Änderung des 222 nm-Signals nach Zugabe von Mg^{++} - und Ca^{++} -Ionen (1 mM)

In Abb. 3-10 A ist zu erkennen, dass das typische CD-Profil bei Zugabe von 1 mM Kalzium fast vollständig kollabiert. Dabei ist zu bedenken, dass die Messung erst eine gewisse Zeit nach der Ca^{++} -Applikation beginnen kann und die Messung selber ebenfalls einen bestimmten Zeitraum in Anspruch nimmt. Dies wäre dann irrelevant, wenn es sich um einen statischen Effekt handelte. Abb. 3-10 B zeigt jedoch, dass dies nicht der Fall ist. Hier wurde die zeitliche Veränderung des 222 nm-Signals aufgezeichnet, wobei die erwähnte Verzögerung von ca. 90 Sekunden entsprechend abzulesen ist. Die Konstanz der Messwerte im Vergleich zur Pufferkontrolle bei Zugabe von 1 mM MgCl_2 ist hier ebenfalls angezeigt. Der Verlauf des Ca^{++} -Signals zeigt den dynamischen Effekt auf den 222 nm-Messwert. Der Kurvenverlauf legt nahe, dass auf eine anfänglich starke Änderung eine zunächst rasche, dann retardierende Erholung folgt. Mg^{++} -Ionen beeinflussen die strukturellen Messdaten mindestens für dieses Fragment, das größte aller untersuchten, nicht. Der Kalzium-Effekt lässt insbesondere vor dem Hintergrund der Magnesium-Kontrolle Raum für weitere Untersuchungen und Überlegungen, auf die in der Diskussion kurz eingegangen werden wird.

3.3.4 Löslichkeit

Die vergleichende Löslichkeit der Fragmente in einem gegebenen Puffersystem wurde anhand eines Sedimentationsassays untersucht. Alternativ hätten sich photometrische Tests angeboten, die sich die kolloidale Streuung von Aggregatsuspensionen zu Nutze machen. Da diese Streuung jedoch stark von der unvorhersagbaren und möglicherweise fragment-spezifischen Natur der entstehenden Partikel abhängt, wurde die quantitative Bestimmung des Proteins im Überstand einer durch Zentrifugation geklärten Suspension vorgezogen. Auch die Ergebnisse einer solchen Untersuchung sind als relativ einzustufen und spezifisch für das verwendete Puffersystem, das hier in Anlehnung an die Lösungen zur Darstellung von Parakristallen gewählt wurde. Das Ziel dieser Untersuchungen, Aussagen zum Einfluss einzelner Sequenzen und Domänen auf die Löslichkeit der verschiedenen Fragmente zu sammeln, ist von dieser Einschränkung nicht betroffen. Die Ergebnisse der Löslichkeitsbestimmungen sind in Abb. 3-11 dargestellt, wobei sich der 100 %-Wert aus der Proteinbestimmung des in 0,6 M KCl-Puffer gelösten Fragments unmittelbar vor der Dialyse ergibt. Bei jedem Messpunkt handelt es sich um das Mittel einer Doppelbestimmung, die Darstellung in Kurvenform scheint durch die mathematische Überprüfung der Übereinstimmung mit der gewählten Regression (Programm SigmaPlot: sigmoid mit 4 Parametern) gerechtfertigt: Die statistische Kenngröße R^2 ist in allen Fällen > 0.99 , wobei 1 eine 100 %ige Übereinstimmung anzeigt. Die Kurven für die acht Proteine sind so zusammengestellt, dass die Tendenzen betont werden.

Allgemein ist zum einen zu erkennen, dass in keinem Fall eine vollständige Ausfällbarkeit bzw. Sedimentierbarkeit erreicht wurde: die Messwerte im unteren Schenkel des Sigmoids liegen zwischen 5 und 20 % des Maximalwertes. Auch am entgegengesetzten Ende der Kurven zeichnet sich ein ähnlicher Effekt ab: keines der Fragmente blieb nach Dialyse über Nacht komplett in Lösung, so dass wiederum zwischen 5 und 20 % des Proteins pelletiert wurden. Als charakteristische Größe zum direkten quantitativen Vergleich der Löslichkeit wurde der S_{50} -Wert, d.h. die molare KCl-Konzentration, die halbmaximaler Löslichkeit entspricht, aus diesen Regressionskurven ermittelt (Tab. 3-4); hohe S_{50} -Werte zeigen somit geringere Löslichkeit an.

Alle S_{50} -Werte liegen in einem recht engen Bereich zwischen 0,27 und 0,36 M KCl, jedoch zeichnen sich zwei Tendenzen beim Vergleich der Proteine untereinander ab: Zunächst weisen die kürzeren Fragmente (2-x) durchweg eine vergleichsweise geringere Löslichkeit auf, insbesondere, wenn man den direkten Vergleich zum jeweils N-terminal längeren Pendant (3-x) heranzieht. Die mittlere Differenz der S_{50} -Werte zweier Proteine mit gleichem C-Terminus (+/- MHC3-Abschnitt) beträgt 50 mM KCl. Ein möglicher zweiter Effekt deutet sich hier an: Die Löslichkeit der mutierten Fragmente scheint relativ zu den anderen Fragmenten der jeweiligen Gruppe größerer bzw. kleinerer Proteine erhöht.

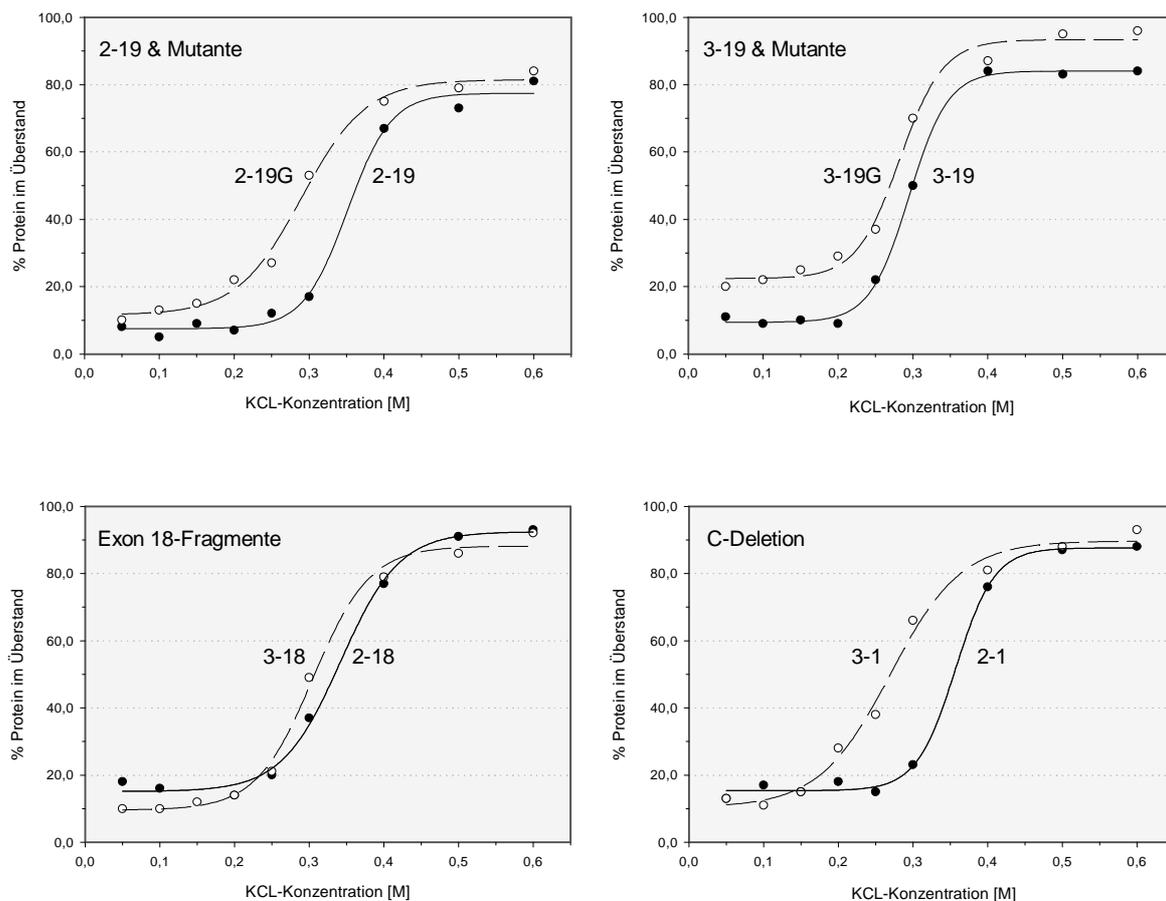


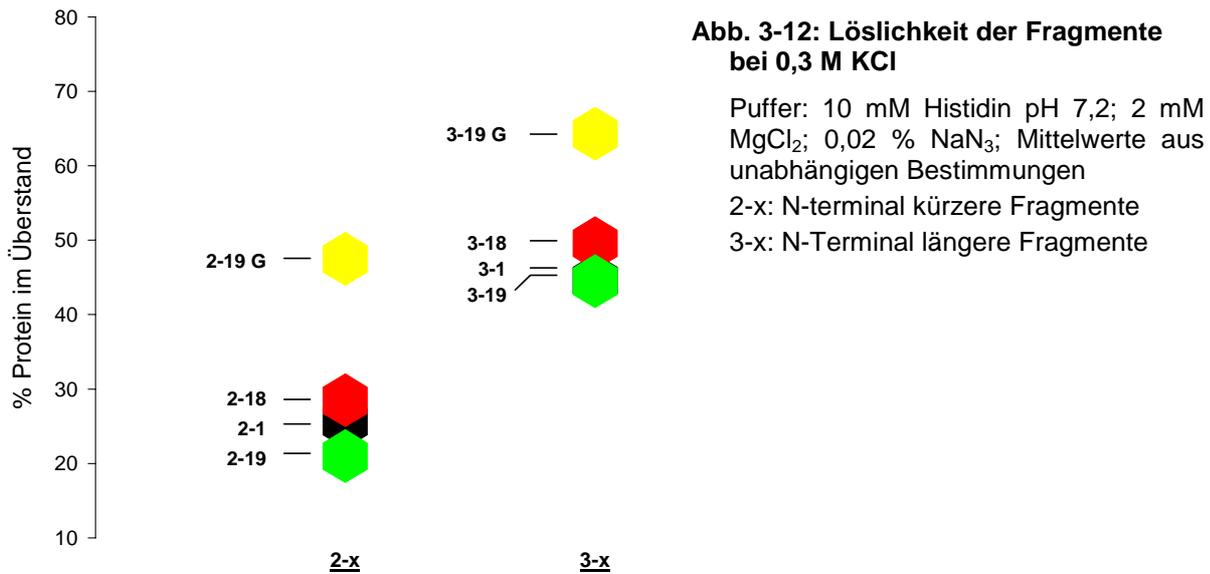
Abb. 3-11: Löslichkeitscharakteristiken der Fragmente; sigmoide Regression

Puffer: var. KCl; 10 mM Histidin pH 7,2; 2 mM MgCl₂; 0,02 % NaN₃

Tab. 3-4: KCl-Konzentration der halbmaximalen Löslichkeit (Abb. 3-11) der einzelnen Fragmente

Fragment	3-19G	3-19	3-18	3-1	2-19G	2-19	2-18	2-1
S ₅₀ [M KCl]	0,27	0,3	0,31	0,27	0,3	0,36	0,34	0,35

Um etwaige kleinere Unterschiede deutlicher zu etablieren, wurde der offensichtlich kritische Bereich um 0,3 M KCl in unabhängigen Versuchen wiederholt getestet. Das Ergebnis für diese Konzentration, bei der die größten Unterschiede zwischen den einzelnen Fragmenten zu verzeichnen sind, ist in Abb. 3-12 dargestellt. Die Anzahl der Parallelmessungen schwankt dabei zwischen n=2 und n=4, weshalb in der Darstellung lediglich die Mittelwerte aufgetragen sind. Diese Versuche wurden auch herangezogen, um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen: Der Mittelwert aus 32 Variationskoeffizienten beträgt dabei lediglich 5,55 %.



Die angesprochenen Tendenzen treten hier noch deutlicher hervor. N-terminal längere Fragmente (3-x) sind löslicher als ihre jeweiligen Entsprechungen ohne den MHC3-Abschnitt (2-x). Deutlich hebt sich innerhalb der Fragmente einer Größengruppe das mutierte Fragment (2-19G und 3-19G) als das löslichste ab.

3.4 Cytosolische Strukturen in Bakterien

Aus der in Kap. 3.3 beschriebenen außergewöhnlichen Expressionseffizienz des verwendeten Systems im Zusammenwirken mit den hier produzierten Fragmenten und der Tatsache, dass die Proteine nicht in *inclusion bodies* (Einschlusskörper von denaturiertem, unlöslichem Zielpeptid) vorlagen, konnte geschlossen werden, dass die Fragmente auch innerhalb der Bakterien Aggregate und womöglich geordnete Strukturen bildeten. Aus diesem Grund wurde eine Einbettung von Bakterienpellets nach dem üblichen Induktionszeitraum vorgenommen und Dünnschnitte für die elektronenmikroskopische Analyse angefertigt. Am Beispiel des Fragments 2-19 wurden Aufnahmen dieser Strukturen ausgewertet; das Ergebnis ist in Abb. 3-13 dargestellt.

In Abb. 3-13 A ist das allgemeine Erscheinungsbild der exprimierenden Bakterien dargestellt. Unter der Murein-Zellwand ist ein schmaler Saum von körnig erscheinendem Cytoplasma zu erkennen, während der gesamte Rest der Zellen von homogenem Material angefüllt ist, das gar eine weitere Zellteilung zu verhindern in der Lage ist, wie im zentral abgebildeten Bakterium zu beobachten. Die hier schon schwach auszumachende Streifung quer zur Längsachse der Zelle deutet bereits an, dass es sich um geordnete Zusammenlagerungen handelt.

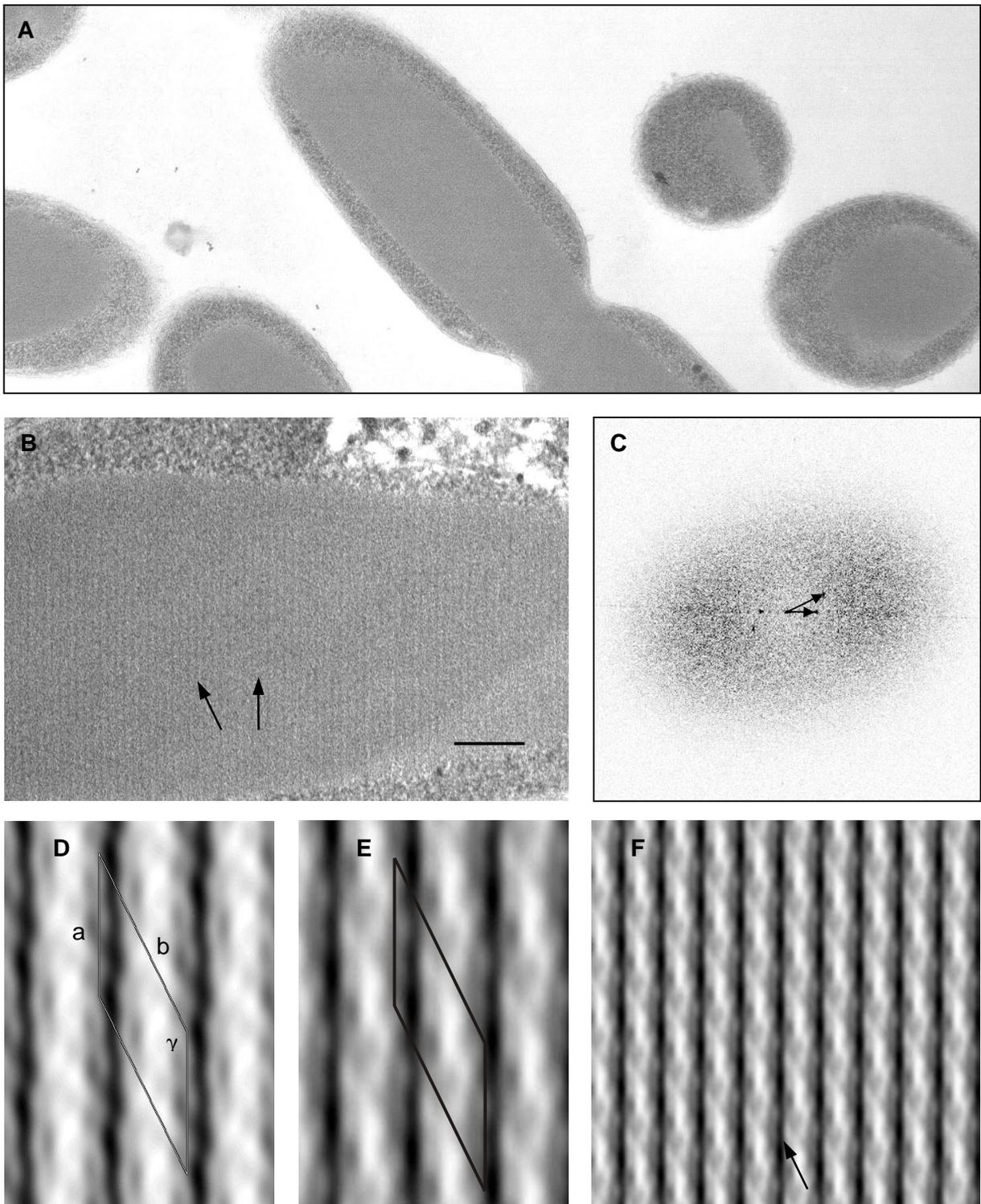


Abb. 3-13: Schnitte durch ein Pellet von 2-19-exprimierenden Bakterien und Auswertung

A: Übersichtsbild über mehrere Zellen in unterschiedlicher Orientierung

B: Nahaufnahme eines Bakteriums; Balken = 100 nm; Pfeile: Richtung periodischer Querstreifungen

C: Fourier-Transformation (FFT) eines Ausschnittes aus B; Pfeile markieren Richtung und reziproken Abstand der Perioden

D und E: Filterungen auf die in C markierten Reflexionen und deren Ordnungen anhand von FFT's unterschiedlicher Regionen in B, die entsprechenden Einheitszellen der Dimensionen $a = 19,3$ nm, $b = 26,8$ nm und $\gamma = 154,6^\circ$ sind integriert

F: Übersicht auf die Rekonstruktion in E; Pfeil: Richtung der schwächeren Periode (kürzerer Abstand)

Wie hoch dieser Ordnungsgrad tatsächlich ist, wird in den nachfolgenden Abbildungen deutlich: Das Proteinmaterial weist an bevorzugten Stellen, d.h. in bestimmten Schnittrichtungen, periodische Charakteristiken in 2 Dimensionen auf. Diese sind bei Betrachtung der Abb. 3-13 B unter spitzem Winkel zur Papierebene in den markierten Richtungen sichtbar und schlagen sich in der zugehörigen Fourier-Transformation (Abb. 3-13 C) in zwei prominenten Reflexionen nieder. Man kann also aufgrund der Anwesenheit eines mindestens zweidimensionalen Musters von einer kristallinen Anordnung sprechen. Die in 3-13 C markierten Netzebenen-Abstände wurden nun zur computergestützten Erstellung der 2-D-Maps in Abb. 3-13 D und E verwendet. In diese Rekonstruktionen fließen neben den gewählten Abständen sämtliche Orte der FFT mit ein, die den jeweiligen Obertönen (Ordnungen) entsprechen, so dass alle auf diesem Gitter liegenden Punkte innerhalb der Transformation erfasst werden. Die prominenten Reflexionen beschreiben dabei eine Einheitszelle der Dimensionen $a = 19,3 \text{ nm}$, $b = 26,8 \text{ nm}$ und $\gamma = 154,6^\circ$, die in die Rekonstruktionen graphisch integriert ist. Diese Werte leiten sich als Mittelwert aus Bestimmungen an verschiedenen FFTs ab (Programm CRISP; $n=7$). In Abb. 3-13 F schließlich ist eine Übersicht über das 2-D-Muster in E dargestellt, an der neben der prominenten vertikalen Querstreifung auch die dem zweiten Beugungspunkt entsprechende Periode unter flachem Blickwinkel zu erkennen ist. Die Rekonstruktionen ergeben durch die Einbeziehung aller Gitterpunkte ein zwar grob strukturiertes, aber dezidiertes Bild der periodischen Strukturen: Die vertikal verlaufenden Elemente einer Breite von $11,5 \text{ nm}$ (rechnerisch aus oben genannter Einheitszelle) zeigen nun ein Relief, dessen Ausprägung örtlich variieren kann (Vergleich von D und E), aber deutliche Verwandtschaft erkennen lässt. Dabei ergänzen sich erhabene und vertiefte Substrukturen zu weiteren periodischen Eigenschaften, die weder im Original noch in der FFT als Beugungspunkte eindeutig zu erkennen sind, da sie zu schwach definiert sind. Die bei der Aufsicht auf F augenfällige, verschwommene Modulation im linksgerichteten Winkel von ca. 23° zur Horizontalen beispielsweise kann in Verlängerung der Blickrichtung auf das Original in B erahnt werden.

Die grobe Strukturierung der 2-D-Maps deutet eine relativ schwache Auflösung des Präparates an, die eine Identifizierung von Einzelmolekülen nicht erlaubt.

3.5 Phosphorylierung von *Drosophila*-Myosin

3.5.1 Markierung von Proteinen des Thorax *in situ*

Von den verschiedenen Isoformen, die vom einzigen *Drosophila*-MHC-Gen durch alternatives splicing generiert werden, unterscheiden sich zwei in ihrem C-Terminus, der gewebs- und stadienspezifisch entweder von Exon 18 oder von Exon 19 kodiert wird. Da der Exon 19-Bereich, ein *random coil*-Abschnitt, eine Konsensus-Sequenz für Protein-Kinase C aufweist,

wurden Untersuchungen zur möglichen posttranslationalen Modifikation in Form einer Phosphat-Inkorporation in die Schweren Ketten bei *Drosophila* durchgeführt. Zum Hinweis auf eine Phosphorylierbarkeit *in vivo* wurde eine ^{32}P -*ortho*-Phosphat-Inkubation von ganzen Thoraces herangezogen, um den Zellverbund intakt zu halten. Diese wurden derart aufgearbeitet, dass überwiegend myofibrilläre Proteine einer 2-dimensionalen Elektrophorese unterzogen und nachfolgend auf Nitrocellulose-Membran transferiert wurden. Der Blot wurde auf dreifache Weise analysiert, die Ergebnisse dieser Behandlungen sind in Abb. 3-14 dargestellt.

Nach autoradiographischer Exposition der Blotmembran zur Detektion der Inkorporation der Phosphat-Markierung (Abb. 3-14 C) wurde eine reversible Allgemeinfärbung der Proteine durchgeführt (Abb. 3-14 A), um abschließend die Schweren Ketten des Myosins durch eine Immunfärbung zu lokalisieren (Abb. 3-14 B):

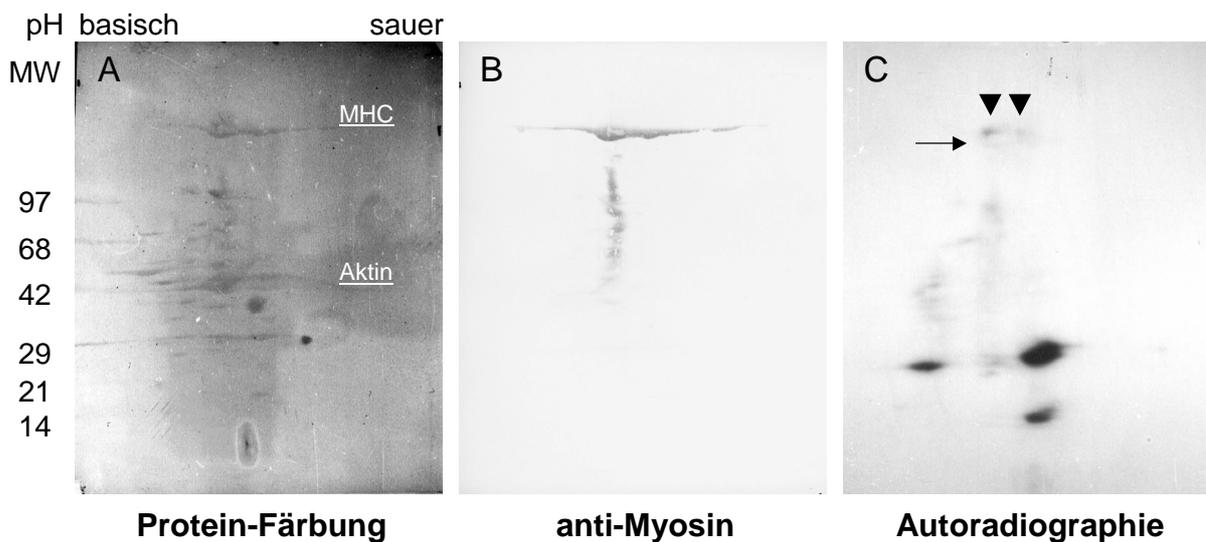


Abb. 3-14: Blotanalyse einer 2-D-Gelelektrophorese von *Drosophila*-Thorax-Proteinen nach Markierung mit ^{32}P -*ortho*-Phosphat:

1. Dimension: IEF pH 3-10; 2.Dimension: SDS-PAGE 5-15 %

A: Proteinfärbung mit "fast green"; markiert sind die vertikalen Positionen der Hauptkomponenten des Muskels: Myosin-HC, Aktin

B: Nachweis der Myosin-HC mit polyklonalem anti-Heuschreckenmyosin-Serum

C: Autoradiographie nach 2 Tagen Exposition; Pfeilspitzen zeigen MHC-Markierungen; der Pfeil markiert eine schwächere Inkorporation unterhalb der MHC-„spots“

Die Allgemeinfärbung in Abb. 3-14 A weist als Hauptkomponenten deutlich die charakteristischen Myofibrillenmarker der Myosin-Schweren Kette und des Aktins auf, an denen die Auftrennung des Proteingemischs qualitativ nachvollzogen werden kann. Eine horizontale Elongation von Färbungsintensitäten („spots“) ist über den gesamten Bereich zu verzeichnen,

wenn auch Aktin und einige andere Proteine vergleichsweise scharf fokussiert erscheinen. Am augenfälligsten ist dieser Effekt an den Myosin-HC's zu beobachten, wie auch die Immunfärbung in B ausweist. Grundsätzlich ist es schwierig, große Proteine, die zudem eine Tendenz zur Aggregation besitzen, in der ersten Dimension zu fokussieren, da eine Retardierung durch die Polyacrylamid-Matrix unvermeidbar ist. Aus diesem Grund war eine relativ hohe Voltstundenzahl veranschlagt worden. Dies führt in nicht immobilisierten pH-Gradienten zu einer verstärkten Ausprägung der sog. Kathodendrift, bei der Proteine im basischen Bereich verloren werden. Ganz allgemein ist bekannt, dass auf diese klassische Weise durchgeführte IEF's eine hohe Anfälligkeit für chargenspezifische Ergebnisse aufweisen. Die erwähnte Kathodendrift, auf die auch eine Verbreiterung von *spots* zurückgeführt werden kann, wird beim Abgleich der theoretischen pI 's von *Drosophila*-MHC (5,6) und -Aktin (5,3) mit den Wanderungstrecken in der ersten Dimension deutlich. Dieser Vergleich zeigt, dass eine Bestimmung des absoluten pI 's der detektierten *spots* im mobilen System mit nicht-stationären Ampholyten (hier pI 3-10) sehr erschwert ist. Aus diesem Grund ist eine spezifische Identifizierung der MHC-Untereinheit von besonderer Bedeutung. Die Immunfärbung in B markiert eine breite Bande, die in dieser Form auch in der Allgemeinfärbung zu erkennen ist. Sie weist im zentralen Bereich zwei Verdickungen auf, an denen sich MHCs konzentrieren, wobei der basischere Bauch deutlich mehr Protein aufweist. Zudem sind eine ganze Reihe von Abbauprodukten bis hinunter in den Molekulargewichtsbereich um 50 kDa zu erkennen.

Die Autoradiographie wird von Phosphat-Einbau in Proteine im kleineren Gewichtsbereich dominiert: Die stärkste Markierung entfällt auf einen offensichtlich substrukturierten *spot* um 30 kDa im sauren Bereich. Ein weiterer *spot* weist ähnliches Molekulargewicht, jedoch einen höheren pI auf. Zwischen 15 und 20 kDa ist ebenfalls ein verstärkter Einbau von ^{32}P in eine Kombination von Proteinen (Haupt*spot* mit Satellit) zu verzeichnen. Hier sollten die Leichten Ketten des Myosins lokalisiert sein. Weitere diffuse Schwärzungen um 30 kDa, möglicherweise ein von Weitkamp *et al.* (1998) identifiziertes Substrat der Projektin-Kinase (Weitkamp *et al.*, 1998), und eine um 100 kDa, bei der es sich um phosphoryliertes Paramyosin handeln dürfte, ergänzen das Bild.

Im hier relevanten Molekulargewichtsbereich um 200 kDa sind in der Autoradiographie Markierungen zu erkennen, die sämtlich in den durch Antikörper gefärbten Bereich fallen. Dabei ist eine laterale Aufspaltung in zwei Bereiche festzustellen, die in ihrer Position mit den oben beschriebenen Bäuchen der MHC-Immunfärbung koinzidieren. Dabei fällt die basischere Markierung ganz analog zur Proteindichte deutlich intensiver aus. Knapp unterhalb dieser relativ deutlichen Inkorporation scheint zudem ein weiterer, allerdings sehr schwach markierter *spot* erkennbar (Pfeil).

3.5.2 *in vitro*-Phosphorylierung von Fragmenten

Nachdem gezeigt war, dass Myosin-HCs in intakten Zellen phosphoryliert werden können, sollte nun in einem *in vitro*-Ansatz unter Verwendung radioaktiv markierten γ -ATP's der Frage nachgegangen werden, ob ein Phosphat-Einbau im aggregationsfähigen Teil des Moleküls erfolgen kann. Da der Fokus dieser Experimente ursprünglich auf die Untersuchung C-terminaler Sequenzen gerichtet war, wurden hierfür die N-terminal deletierten kleineren Fragmente eingesetzt, um den Bereich einer möglichen Phosphorylierungsstelle so weit wie möglich einzugrenzen. Der Einsatz von käuflichen Kinasen hätte einen nur schwachen Hinweis auf LMM als ein physiologisch relevantes Substrat geliefert. Zudem wird eine potentielle Phosphorylierungsstelle im C-terminalen Bereich stadienspezifisch exprimiert. Aus diesen Gründen wurden grobe Fraktionierungen aus *Drosophila*-Thoraces und larvalen Cuticulae als potentiell aktive Gemische für diese Versuche verwendet. Nach Abtrennung der cytosolischen Fraktion (Fraktion I) und Entfernen membranumhüllter Zellbestandteile wurde das in Puffer niedriger Ionenstärke unlösliche Proteinmaterial (vorwiegend Bestandteile des Muskelapparates und Cytoskeletts) in drei Stufen aufsteigender Ionenstärke (Fraktionen II- IV) extrahiert. Dabei werden schrittweise schwerer lösliche Komponenten freigesetzt. Den Ansätzen wurden Kinase-Aktivatoren wie cAMP und Ca^{++} zugesetzt, um unter möglichst optimierten Bedingungen zu arbeiten. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert. Abb. 3-15 zeigt die Ergebnisse einschließlich der Fraktions-Kontrollen für die Ansätze des Fragments 2-19 G, der Ser \rightarrow Glu-Mutante. Die Kontrollansätze mit exprimiertem Protein alleine waren in allen Fällen negativ, d.h. es konnte unter den gegebenen Expositionsbedingungen kein Signal detektiert werden.

Das Kontrollgel in Abb. 3-15 A belegt den geringen Proteingehalt der eingesetzten potentiell aktiven Fraktionen: lediglich in den Fraktionen A III und IV sind nennenswerte Mengen an Myosin-HC um 200 kDa und vermutlich Aktin bei 45 kDa auszumachen; Aktin bildet erfahrungsgemäß die stärkste Verunreinigung von Myosin unter diesen Extraktionsbedingungen. In Spuren sind diese myofibrillären Hauptkomponenten auch in Fraktion L IV wiederzufinden. In Fraktion L I ist im Aktinbereich eine verschwommene Bande in dieser Reproduktion nicht mehr zu erkennen. Das zugehörige Autoradiogramm in Abb. 3-15 B zeigt diffuse Schwärzung im Bereich der MHC-Banden und – im Fall der Fraktion L I - ein phosphoryliertes Protein von 55 kDa; in letzterem Ansatz scheinen auch kleinere Komponenten unter diesen Bedingungen als Kinasesubstrate zu fungieren.

Als Detail des Gels der Kombinationsansätze in Abb. 3-15 C, das den gleichmäßigen Auftrag des Fragments bei 52,7 kDa belegt, seien die hier besser fokussierten Banden bei 45 kDa erwähnt. Im Falle der L I-Probe, die dieses Protein bei gleichem Molekulargewicht aufweist, müsste es sich dann um G-Aktin handeln, da in der cytosolischen Fraktion lediglich lösliche Proteine auftauchen sollten. In Übereinstimmung mit der Kontrolle zeigt die Autoradiographie

dieses Ansatzes in Abb. 3-15 D die Markierung bei 55 kDa in gleicher Intensität. Auch die MHC-Markierungen der Ansätze A III und IV sind ähnlich wie in den Kontrollen vorhanden, wengleich hier eine Tendenz zu einer Doppelbande zu erkennen ist.

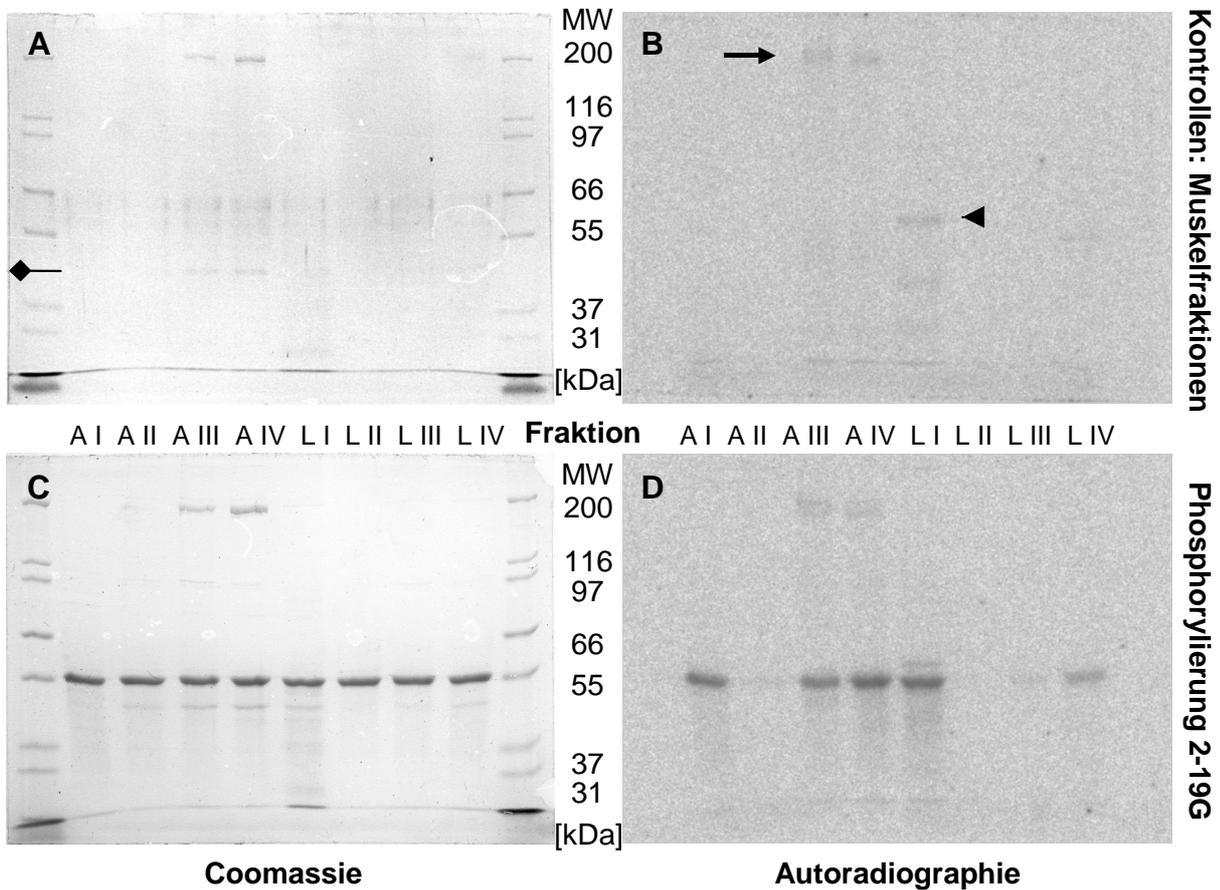


Abb. 3-15: *in vitro*-Phosphorylierung des Fragments 2-19 G

7,5 %-SDS-Gele; 0,9 µg Fragment / Bahn (C und D)

Legende: A: adult; L: larval; I: cytosolische Fraktion; II: 5 mM PP_i -Extrakt; III: 15 mM PP_i -Extrakt; IV: 40 mM PP_i -Extrakt

A: Coomassie-Färbung: Gel der Fraktions-Kontrollen; Markierung weist auf 45 kDa-Banden

B: Autoradiogramm von A; Pfeil: MHC-Markierung, Pfeilspitze: 55 kDa-Protein

C: Coomassie-Färbung: Gel der Fragment-Phosphorylierungsansätze

D: Autoradiogramm von C

Das Fragment 2-19 G wird in den verschiedenen Ansätzen in unterschiedlichem Maße phosphoryliert. Die cytosolischen Fraktionen der Adult- und Larval-Präparationen katalysieren eine vergleichsweise starke Phosphatübertragung auf das exprimierte Polypeptid. Auch in den Extrakten aus unlöslichen Proteinen ist eine Kinase-Aktivität evident, die mit zunehmender Ionenstärke des Extraktionspuffers ansteigt. Diese Markierungen fallen in den Proben der Larvenpräparation verglichen mit der Inkorporation im Fraktion I-Ansatz weniger intensiv aus. Da durch die Mutation eine potentielle Phosphorylierungsstelle ausgeschaltet

worden war, mussten sich die modifizierten Reste außerhalb der von Exon 19 kodierten Domäne, die des Weiteren weder Serin noch Threonin noch Tyrosin aufweist, befinden. Tatsächlich zeigt der in Tab. 3-5 zusammengefasste, quantitative Vergleich durch Densitometrie der jeweiligen Autoradiographie-Banden, dass die hier für 2-19 G repräsentativ dargestellten Tendenzen bei sämtlichen untersuchten Proteinen zu beobachten sind:

Tab. 3-5: Densitometrische Auswertung der fragmentspezifischen Autoradiographie-Signale nach Inkubation aller kleinen Fragmente mit Muskelfraktionen in Gegenwart von ^{32}P - γ -ATP:

Bestimmung der additiven Schwärzung im 8-bit-Graustufenbild (Programm: TINA; Regionen gleichen Flächeninhalts; Hintergrund-korrigiert); Abkürzungen: s. Abb. 3-15

Fragment \ Fraktion	A I	A II	A III	A IV	L I	L II	L III	L IV
2-1	4670	1085	3700	5440	5400	985	1005	2060
2-18	3800	945	3170	4125	4700	675	810	2080
2-19	4609	974	4560	5700	5800	712	988	2370
2-19G	4490	960	4060	5510	5600	645	895	2440

Dabei müssen die fragmentspezifischen Unterschiede auf der Basis dieser Daten als nicht signifikant eingestuft werden, da es sich um Einzelmessungen handelt. Erwähnenswert scheint jedoch, dass die Messwerte für das Fragment 2-18 mit Ausnahme der L IV-Behandlung andeuten könnten, dass dieses Protein ein schlechteres Substrat darstellt. Diese Tendenz ist auch in unabhängigen Szintillationsmessungen am Beispiel der cytosolischen Fraktionen beobachtet worden (nicht dargestellt).

Generell werden jedoch die oben beschriebenen Effekte bei allen anderen Fragmenten bestätigt: Neben den vergleichsweise hohen Raten an ^{32}P -Einbau nach Behandlung mit der cytosolischen Fraktion I ist ein kontinuierlicher Anstieg der Markierungen in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Extraktionspuffers zu verzeichnen, der bei den Larvenextrakten (L I-L IV) weniger stark ausgeprägt ist.

3.5.3 Aggregate von phosphorylierten Fragmenten

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Ergebnisse zeigen einerseits, dass innerhalb des *Drosophila*-LMM-Abschnittes phosphorylierbare Reste existieren. Eine mögliche physiologische Relevanz dieses Befundes deutet sich durch die Verwendung aktiver Fraktionen aus dem Organismus und die *in situ*-Markierung von Schweren Ketten an. Eine Möglichkeit, diese Hypothese mit den hier angewendeten Methoden zu stützen, ist die Untersuchung des Einflusses einer solchen Modifikation auf das Erscheinungsbild von Aggregaten. Dies wurde am Beispiel des Fragments 2-19 versucht, das besonders charakteristische Parakristalle ausbildet (s. Kap. 3.7.4). Hierzu wurde das Protein analog zu den Markie-

rungsansätzen mit besonders Kinase-aktiven Muskelfractionen inkubiert. Danach wurde die Aggregation der gelösten Moleküle durch Herabsetzen der Ionenstärke (Dialyse) induziert. Die entstehenden Parakristalle wurden elektronenmikroskopisch und anhand von Fourier-Transformationen der Bänderungsmuster charakterisiert (Abb. 3-16).

Das Aggregat aus dem Kontrollansatz in Abb. 3-16 A ist sichtbar unregelmäßig aufgebaut. Von spindelförmiger Grundgestalt zeigt es eine deutliche Substrukturierung in Form von Riefen und Vertiefungen. Allgemein war es schwierig, in diesem Präparat auswertbare Objekte zu finden, so dass der abgebildete Parakristall als vergleichsweise optimal bezeichnet werden muss. Das Muster von Querstreifungen ist undeutlich ausgeprägt und Regelmäßigkeiten bleiben bei visueller Inspektion verborgen. Lediglich die Fourier-Transformation, die schwach definiert ist, eröffnet die Möglichkeit, periodische Tendenzen aufzudecken: Sie weist Beugungspunkte auf, die Abständen von 14,5 nm und deren Ordnungen entsprechen und auf oder um eine Achse konzentriert sind. Diese kann man hier nur vorbehaltlich als Meridian bezeichnen, da die horizontale Ordnung im Aggregat nicht einheitlich erscheint. Daneben ist eine Reihe von Reflexionen und Beugungslinien zu verzeichnen, deren Abstände in guter Näherung Ordnungen von 116 nm entsprechen. Im Einzelnen handelt es sich dabei um die 3., 5., 11., 13. und 29. Ordnung dieser für den asynchronen Insektenflugmuskel typischen Größe. Zwar sind sowohl das erkennbare Muster dieses Kontrollobjekts wie auch die FFT nicht sehr prägnant ausgebildet, jedoch ist die Anzahl von Intensitäten in der Transformation vergleichsweise hoch.

Wie schon für die Kontrolle beschrieben, ist den Parakristallen der behandelten Proben ein sehr schwach ausgeprägtes Bänderungsmuster gemeinsam, das sich wiederum in einem entsprechend schlecht definierten Beugungsmuster niederschlägt. Im Unterschied zu Abb. 3-16 A erscheinen jedoch die übrigen Parakristalle nadelförmig mit mehr oder weniger "ausgefranst" Enden. Eine Tendenz zur Substrukturierung fehlt hier; es entsteht der Eindruck, als seien sie in der Breite deutlicher begrenzt. Geordnete Aggregate konnten hier in ausreichender Anzahl gefunden werden. In allen Kombinationsansätzen wird die Transformation von meridionalen Reflexionen bei reziproken Abständen von 14,5 nm und hier besonders der dritten Ordnung beherrscht. Außer diesen Periodizitäten sind in ausgewählten Bereichen zusätzliche, meist nicht-axiale Beugungseigenschaften festzustellen, deren reale Abstände ebenfalls ungeraden Ordnungen von 116 nm entsprechen.

Abb. 3-16: Parakristalle und FFT's derselben von Fragment 2-19 nach Inkubation mit Kinase-aktiven Fraktionen aus *Drosophila*; Balken = 100 nm

Dialyse gegen Aggregationspuffer (150 mM KCl; 10 mM Histidin; 2 mM MgCl₂; 0,02 % NaN₃).

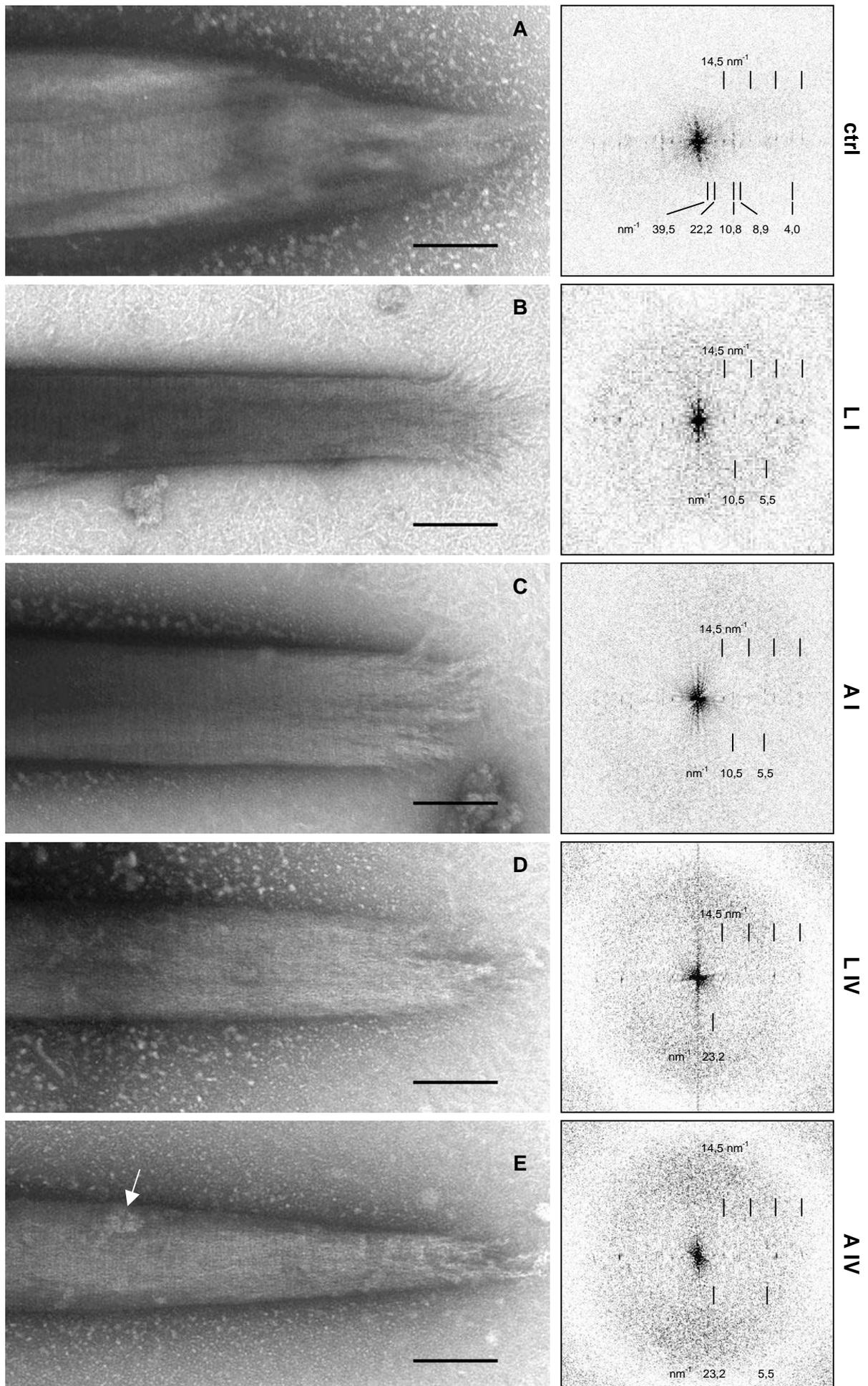
A: Kontrolle: Fragment 2-19 alleine

B: nach Inkubation mit Fraktion L I

C: nach Inkubation mit Fraktion A I

D: nach Inkubation mit Fraktion L IV

E: nach Inkubation mit Fraktion A IV; Pfeil deutet auf globuläres Proteinmaterial



Das Auftreten solcher Reflexionen ist in allen Fällen (Abb. 3-16 B-E) lokal begrenzt und auf wenige Ordnungsgrößen von 116 nm beschränkt. Dabei kann das Muster innerhalb eines gegebenen Parakristalls unabhängig vom Geschehen auf dem Meridian variieren. Die dargestellten Fourier-Transformationen sind also als beispielhaft zu verstehen und können lediglich die Tendenz dieser Aggregate widerspiegeln, neben 14,5 nm-periodischen Eigenschaften zusätzliche übergeordnete Muster aufzuweisen. Unter den beobachteten 116 nm-Ordnungen sind dabei die 5. (23,2 nm), 11. (10,5 nm) und 21. (5,5 nm) zu nennen. Eine Besonderheit der Inkubationsansätze mit den Extrakten höchster Ionenstärke (Fraktionen IV) stellt die Anwesenheit von Myosin-Verunreinigungen aus den Myofibrillen (s. Abb. 3-15) dar. Es kann als wahrscheinlich angesehen werden, dass sich diese in die entstehenden Aggregate integrieren. In der Tat weisen Aggregate aus diesen Proben gelegentlich Anhäufungen von globulärem Proteinmaterial auf (Pfeil in Abb. 3-16 E).

3.6 Wechselwirkung mit Myosin-assoziierten Proteinen

3.6.1 Präparation von Paramyosin und Projektin

Zwei Myosin-assoziierte Schlüsselproteine der dicken Filamente in Insekten sind Paramyosin, das als integraler Bestandteil der Filamente gilt, und Projektin, dem ebenfalls strukturelle Funktionen zugeschrieben werden. Die präparative Verfügbarkeit dieser Proteine aus *Drosophila*-Muskeln ist aus naheliegenden Gründen stark eingeschränkt, weshalb eine Aufarbeitung aus größeren Insekten, dem Totenkopfschwärmer *Acherontia atropos* vorgenommen wurde. Die Isolierung wurde essentiell nach einem im Arbeitskreis etablierten Verfahren nach Kölsch durchgeführt (Kölsch *et al.*, 1995), das eine vorsichtige Extraktion aus Myofibrillen, gefolgt von einer Anionenaustausch-Chromatographie über die Mono Q-Matrix des FPLC-Systems von Pharmacia vorsieht. Kritische Punkte bei der Reinigung sind zunächst die Extraktionsbedingungen im Hinblick auf Ionenstärke, -komposition und mechanische Agitation, um die Kontamination des Extraktes mit Myosin und Aktin zu minimieren. Weiterhin sind die Gegenionen an der Säulenmatrix von essentieller Bedeutung (s. Kap. 2.12.3), um diese Proteine spezifisch zu binden.

Unter den gegebenen Bedingungen eluiert zunächst Projektin in einem vergleichsweise scharfen Peak (Abb. 3-17 A, B). Bei einem Elutionsvolumen zwischen 40 und 50 ml kann Paramyosin gewonnen werden, das mit steigender Ionenstärke zunehmend mit Aktin und Myosin verunreinigt ist. Daher können nur wenige Fraktionen gesammelt und vereinigt werden. Die kontaminierten Fraktionen bilden einen herausragenden Peak jenseits eines Elutionsvolumens von 50 ml (Abb. 3-17 A). Gegen Ende des Gradienten werden Reste von Myosin und Aktin von der Säule gelöst.

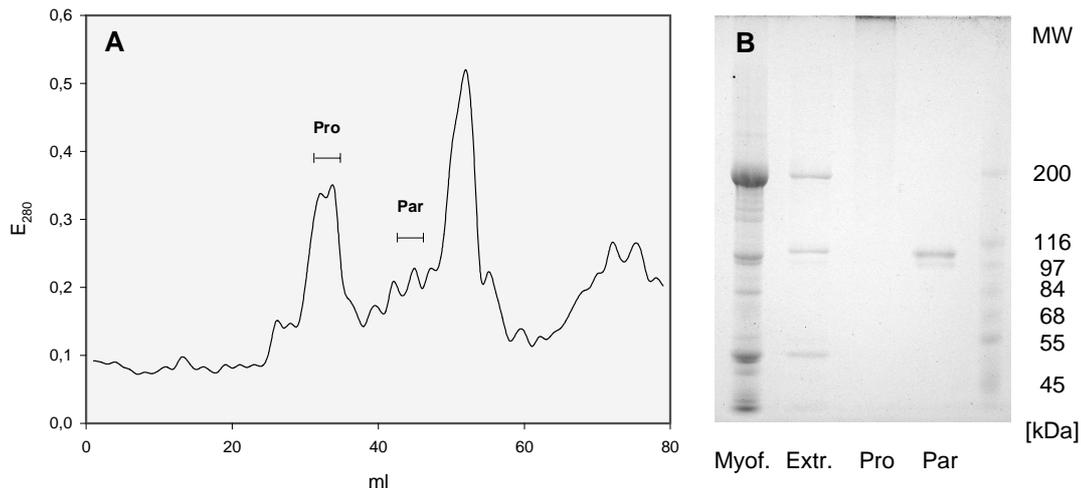


Abb. 3-17: Reinigung von Paramyosin und Projektin (Flugmuskulatur von *Acherontia atropos*)

A: Elutionsprofil der Mono Q-Säule; die Positionen der vereinigten Fraktionen für Projektin (Pro) und Paramyosin (Par) sind angezeigt

B: Einzelschritte der Präparation; 5 % SDS-PAGE

Myof.: Myofibrillen; Extr.: Extrakt; Pro: Projektin; Par: Paramyosin

Das Gel in Abb. 3-17 B fasst die wesentlichen Schritte dieser Reinigung zusammen: Die Probe gewaschener Myofibrillen weist neben den beiden Hauptproteinen Myosin-HC (200 kDa) und Aktin (51 kDa) insbesondere die Paramyosin-Doppelbande zwischen 100 und 110 kDa auf. Daneben fallen Proteine mit apparenten Molekulargewichten von 81 kDa, 59 kDa und eine Reihe von Banden mit Molekulargewichten unterhalb des Aktin ins Auge. Mit 51 kDa apparentem Molekulargewicht erscheint das Aktin-Monomer in dieser Spezies, respektive diesem Muskeltyp merklich größer als üblich (42-45 kDa). Legt man diesen Wert zugrunde, so könnte es sich bei dem 59 kDa-Protein um die Ubiquitin-modifizierte Variante des Aktin handeln, wie für andere Insekten beschrieben (Ball *et al.*, 1987). Eine exakte Zuordnung einzelner Banden bleibt jedoch aufgrund fehlender Sequenz-Daten für die präparierte Art unsicher. So kann die Bande bei 81 kDa auch nur vorbehaltlich als α -Aktinin eingestuft werden. Die regulatorischen Protein-Komplexe der dünnen Filamente setzen sich gewöhnlich aus Komponenten mit Molekulargewichten kleiner 45 kDa zusammen (z.B. Troponin um 35 kDa). Hier wie im Extrakt sind Proteine größer als die Myosin-Schwere Kette aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Konzentration nicht anfärbbar. Die Extraktprobe zeigt die beiden erwähnten Hauptverunreinigungen. Die dritte erkennbare Komponente taucht auch hier als Doppelbande mit Molekulargewichten von 109 und 101 kDa auf. Das relative, densitrometrisch bestimmte Verhältnis dieser Banden in der gereinigten Probe des Paramyosin bleibt verglichen mit der Myofibrillenprobe konstant. Dies mag als ein Hinweis auf die Anwesenheit zweier Isoformen im präparierten Muskeltyp gedeutet werden, jedoch kann eine besondere proteolytische Anfälligkeit nicht ausgeschlossen werden. Die Degradation müsste dann schon während der ersten Präparationsschritte stattgefunden haben, wäh-

rend derer die Proteine aber noch durch den Myofibrillenverbund geschützt sein sollten. Im übrigen demonstrieren die Auftragungen der isolierten Protein die hohe Reinheit der Präparation. Dabei ist Projektin als einzelne Bande an der oberen Gelkante zu erkennen. Es konnten unter diesen Bedingungen aus der Flugmuskulatur von 6 Tieren ca. 0,8 mg Paramyosin und 1,2 mg Projektin gewonnen werden.

3.6.2 Bindungs-ELISA

Zur quantitativen Untersuchung der Wechselwirkung exprimierter Proteine mit den isolierten Myosin-assoziierten Proteinen Paramyosin und Projektin wurde ein Bindungstest auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Die akzessorischen Proteine wurden in konstanter Konzentration an die Oberfläche der Vertiefungen gebunden und die Anlagerung aufsteigender Mengen an biotinylierten Fragmenten über das Avidin-Peroxidase-System nachgewiesen. Für eine gegebene Konzentration an LMM-Protein wurden dazu vier Parallelwerte aufgenommen, die um die unspezifische Bindung an das Blockierungsreagenz (Doppelbestimmungsmittelwert) korrigiert wurden. Die Umrechnung in ng des jeweiligen Proteins erfolgte anhand einer Kalibrierkurve für das biotinylierte Fragment, deren Regression ausnahmslos mit fast 100 %iger Übereinstimmung einer quadratischen Gleichung folgte (Korrelationsdeterminante $R^2 > 0,999$).

Unter den hier gewählten Bedingungen kann für keines der Fragmente eine spezifische Bindung an Projektin nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Die jeweiligen Parallelwerte schwanken in weitem Bereich bei insgesamt niedriger absoluter Menge an gebundenem Protein.

Im Gegensatz dazu wurden für die Bindungen an Paramyosin charakteristische Kurven erhalten, die sich in sehr guter Näherung ($R^2 \geq 0,99$; Ausnahmen: 2-1: 0,942; 2-19G: 0,921) durch eine Hyperbel der Form $y = \frac{ax}{b+x} + cx$ beschreiben lassen (Abb. 3-18). Die Kurven sind in Paaren der korrespondierenden N-terminal verschiedenen Proteine zusammengestellt, so dass die Grundtendenzen illustriert werden.

Als chargenübergreifender Vergleich wurden in drei unabhängigen Messungen unterschiedliche Präparationen des Fragments 3-19 getestet. Abb. 3-19 zeigt deren hohe Übereinstimmung: Die Standardabweichungen bewegen sich in Bereichen, wie sie auch für die Parallelmessungen beobachtet wurden. Die Bindungskurven zeigen durchweg eine Tendenz zu einem Sättigungsverlauf. Die fragmentspezifische Bindung schwankt dabei in weiten Bereichen. Bei der quantitativen Betrachtung müssen bestimmte, methodisch bedingte Einschränkungen berücksichtigt werden. So ist die absolute Menge an tatsächlich an die Kavitäten gebundenem Paramyosin nicht eindeutig zu bestimmen.

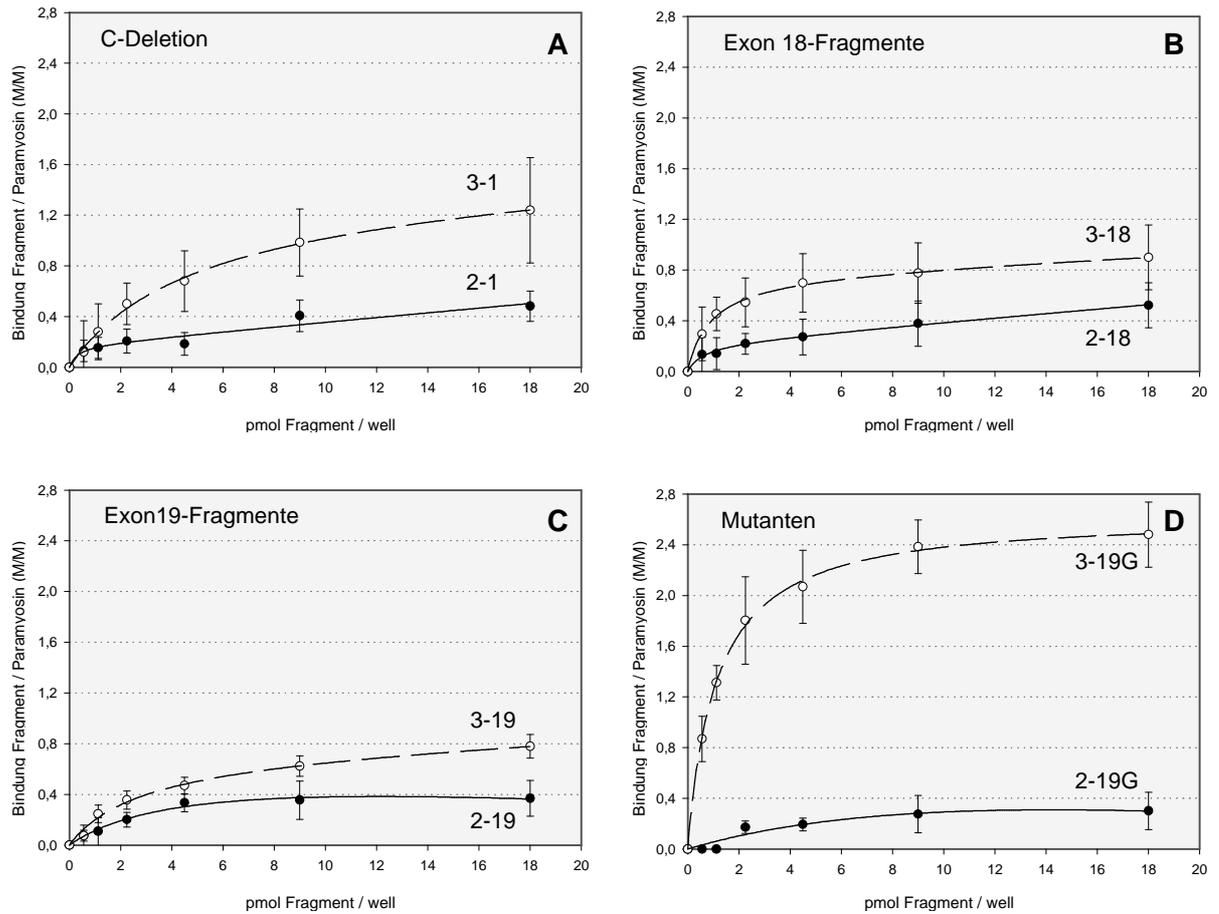


Abb. 3-18: Bindung der Fragmente an Paramyosin

Mittelwerte aus Vierfach-Bestimmungen.

Bindungsbedingungen: 150 mM KCl; 10 mM Imidazol; pH 7,2; 2 mM MgCl₂; 0,05 % MMP.

Vorlage: 150 ng Paramyosin/well (entspricht 0,7 pmol); maximal angebotene Konzentration an Fragment: 1,6 µg/well bzw. 2,4 µg/well für kurze respektive lange Fragmente (entspricht 18 pmol)

A: Bindungskurven für C-terminal deletierte Fragmente **3-1** und **2-1**

B: Bindungskurven für Exon 18 -Fragmente **3-18** und **2-18**

C: Bindungskurven für Exon 19-Fragmente **3-19** und **2-19**

D: Bindungskurven für Glutamat-Mutanten der Exon19-Fragmente **3-19G** und **2-19G**

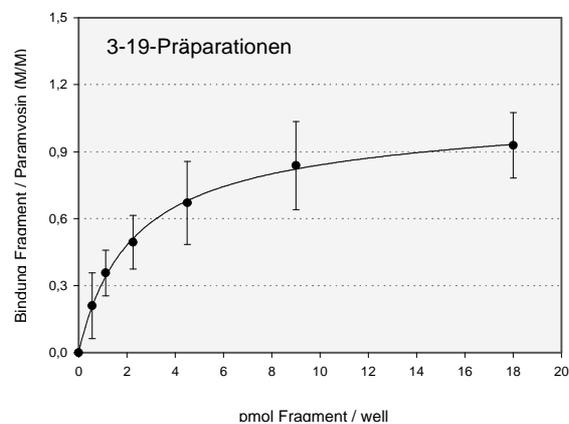


Abb. 3-19: Paramyosin-Bindung unabhängiger Präparationen (n=3) des Fragments 3-19

Des Weiteren muss bei der Quantifizierung an Paramyosin gebundenen Proteins eine Kalibrierkurve zugrunde gelegt werden, die auf Protein-Polystyrol-Wechselwirkung beruht. Dass diese sich nicht ideal verhält, ist der Tatsache zu entnehmen, dass die Kalibrierkurven nur schlecht durch eine lineare Beziehung zu beschreiben sind. Diese systembedingten Einschränkungen beeinträchtigen jedoch nicht die direkte Vergleichbarkeit der Proteine untereinander. Eine Unsicherheit ergibt sich lediglich bei der Interpretation der molaren Bindung. Da die beiden beschriebenen Effekte einen gegenläufigen Einfluss auf das Messergebnis haben, erscheint die gewählte Darstellungsform gerechtfertigt.

Der Maßstab für die unter diesen Bedingungen zu erzielenden maximalen Bindungen ist das Fragment 3-19G, die Mutante des längsten exprimierten Proteins. Alle übrigen längeren Fragmente zeigen eine um einen Faktor 2-3 geringere Bindung an Paramyosin, wobei die individuellen Unterschiede zwischen den drei letztgenannten unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichungen (s.a. Abb. 3-19) als nicht signifikant einzuordnen sind. Die Einführung einer negativen Ladung im Bereich des Exon 19-Abschnittes steigert die maximale Bindung des Fragments 3-19 um den Faktor 3.

Ebenfalls können die geringfügigen Abweichungen der N-terminal verkürzten Proteine untereinander als nicht aussagekräftig bezeichnet werden. Die Bindungen aller kleineren Fragmente fallen jedoch verglichen mit den größeren signifikant niedriger aus: Die Gleichheitswahrscheinlichkeit gegenüber dem jeweils N-terminal längeren Gegenpart geht in allen Fällen gegen 0. Um diesen Unterschied zu quantifizieren, wurden die Differenzfaktoren bei gleicher molarer Auftragsmenge für die einzelnen Paare bestimmt und gemittelt: Der durchschnittliche Abweichungsfaktor der Messwerte kleinerer und größerer Fragmente beträgt für die C-terminal deletierten Fragmente $2,3 \pm 0,9$, die Exon 18-Fragmente $2,4 \pm 0,5$, die Exon 19-Fragmente $2,6 \pm 0,5$ (3-19-Daten: Mittelwerte der in Abb. 3-19 dargestellten unabhängigen Messungen) und für die Mutanten $9,5 \pm 1,2$. Fragmente nativer Primärsequenz binden also in Gegenwart des MHC3-Abschnittes ca. 2,5fach besser an Paramyosin.

3.6.3 Paramyosin-Koaggregation

Ein direkter Ansatz, die gerichtete Interaktion von *coiled coil*-Proteinen zu belegen, liegt in der Möglichkeit, die Bildung geordneter Strukturen unter möglichst physiologischen Bedingungen zu induzieren und diese elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Bindungsstudien können zwar eine Wechselwirkung zweier Komponenten aufzeigen, jedoch nur indirekte Hinweise auf die Spezifität liefern. So stellt sich nach den Ergebnissen der ELISA-Tests beispielsweise die Frage, ob es sich bei den im Vergleich deutlich schwächeren Wechselwirkungen der kleineren Proteine mit Paramyosin noch um geordnete, d.h. Domänen-abhängige Anlagerungen handelt. Daher wurde in Ergänzung zu den ELISA-Messungen versucht, Koaggregate von Paramyosin mit den exprimierten Proteinen herzustellen.

Der Nachweis der strukturellen und funktionellen Integrität des hier präparierten Paramyosins aus *Acherontia* wurde über einen parallelen Aggregationsansatz geführt, der einen Vergleich mit Literaturdaten ermöglicht. Aggregate von isoliertem Paramyosin sind nebst Filterungsergebnissen in Abb. 3-20 dargestellt:

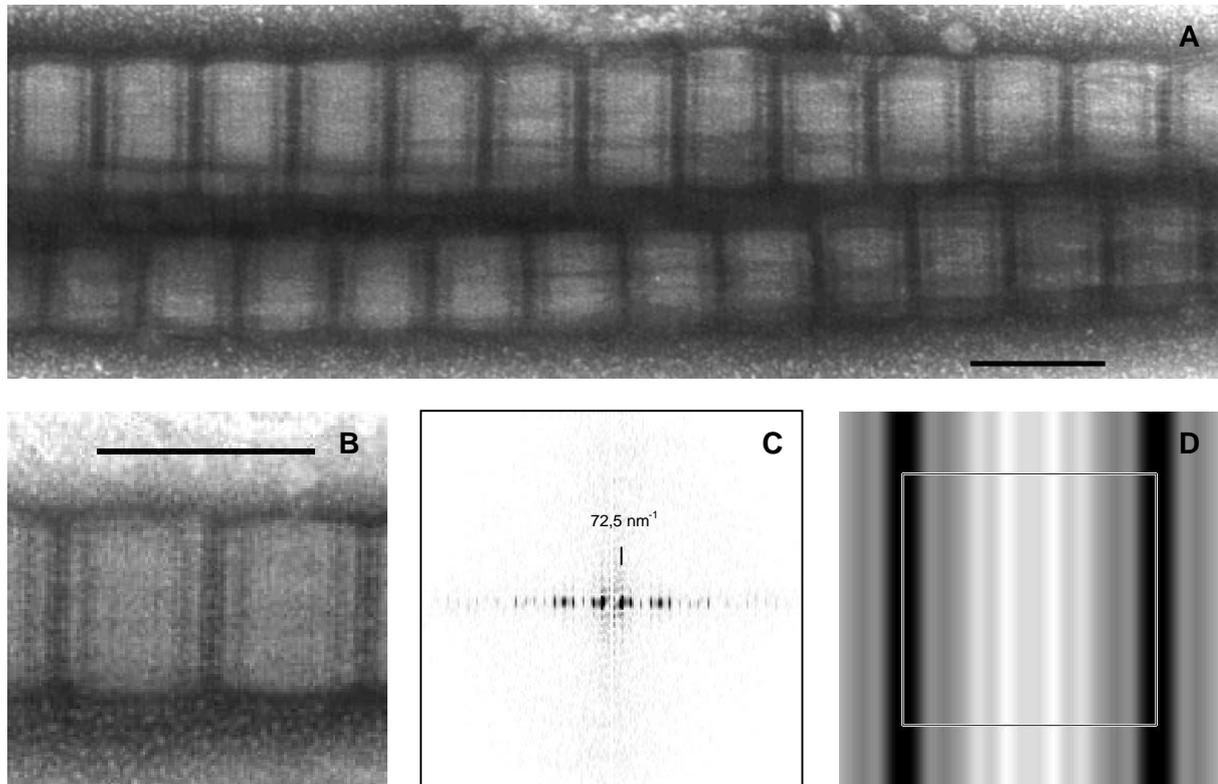


Abb. 3-20: Parakristalle von *Acherontia*-Paramyosin

Herstellung durch Dialyse von gelöstem Paramyosin (in: 600 mM KCl; 10 mM Imidazol, pH 7,2; 2 mM MgCl₂; 0,02 % NaN₃) gegen 150 mM KCl im gleichen Puffersystem

- A: Übersicht** über Parakristalle mit einer Periodizität von 72,5 nm; Balken = 100 nm
B: Vergrößerte Ansicht über 2,5 Perioden eines Parakristalls vom in A dargestellten Typ mit besser erkennbaren Substrukturen; Balken = 100 nm
C: FFT eines solchen Parakristalls, die die Hauptperiode von 72,5 nm und Ordnungen davon bis zur 17. Ordnung zeigt; ein objektbedingter vertikal verlaufender Beugungsartefakt ist ausgeblendet
D: p2-Dichteverteilung einer Filterung auf sämtliche meridionalen Ordnungen von 72,5 nm (Box)

Die in diesem Kontrollansatz erhaltenen Parakristalle sind einheitlich von nadelförmiger Grundgestalt (Abb. 3-20 A) und zeigen bei einer Paramyosin-typischen Periodizität von 72,5 nm einen hohen Grad longitudinaler Ordnung (s.a. FFT in Abb. 3-20 C). Das Grundmuster der Periode ändert sich über die gesamte Länge der Aggregate nicht. Sie wird von ca. 10 nm breiten dunklen Banden niedriger Proteindichte eingerahmt, zwischen denen das Proteinmaterial aufgetrieben erscheint. Schon bei ungefilterter Inspektion des vergrößerten Abschnittes in Abb. 3-20 B ist ein spiegelsymmetrisches Bänderungsmuster erkennbar, dessen Feinstruktur über die Filterung in Abb. 3-20 D verdeutlicht wird. Es

sen Feinstruktur über die Filterung in Abb. 3-20 D verdeutlicht wird. Es handelt sich hier um eine durch Filterung auf die meridionalen Ordnungen von 72,5 nm gewonnene Dichteverteilung mit Spiegelsymmetrie, d.h. es wurde auf eine Spiegelebene innerhalb einer bipolaren Anordnung gefiltert. Dieses Vorgehen ist nicht nur durch die optische Einschätzung begründet, auch das kristallographische Programm CRISP berechnet eine p2-Symmetrie als die wahrscheinlichste. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich um eine Aussage zur ein-dimensionalen Symmetrie handelt. Unter den sieben ein-dimensionalen Gruppen (Hammond, 1997) wäre das vorliegende Muster als pmm2 einzuordnen, jenes mit der höchsten Symmetriestufe. Das spiegelsymmetrische Muster ist geprägt von schmalen Querstreifungen und zeigt beiderseits des dunklen Hauptbandes einen ca. 13 nm breiten Bereich mittlerer Färbungsintensität.

Zur Herstellung der Mischaggregate von Paramyosin mit den exprimierten Fragmenten (molares Verhältnis vor Assoziation 1:1) wurden zwei Puffersubstanzen verwendet, nachdem sich herausgestellt hatte, dass in dem zum Plattentest eingesetzten Imidazol-Puffer die Ausbildung von Parakristallen mit hohem Ordnungsgrad nur schwer zu erreichen war (Abb. 3-21 A und C). Dabei zeigen die kleineren Fragmente zusammen mit Paramyosin eine Neigung zur Bildung amorpher Strukturen (Abb. 3-21 A) ohne erkennbare Querstreifung. Gebänderte Aggregate werden zwar in den Mischpräparaten der größeren Fragmente erhalten, doch auch diese sind von unregelmäßiger Gestalt; in Abb. 3-21 C ist eine "Ausfransung" und nicht integriertes Proteinmaterial in loser Assoziation zum Aggregat zu erkennen.

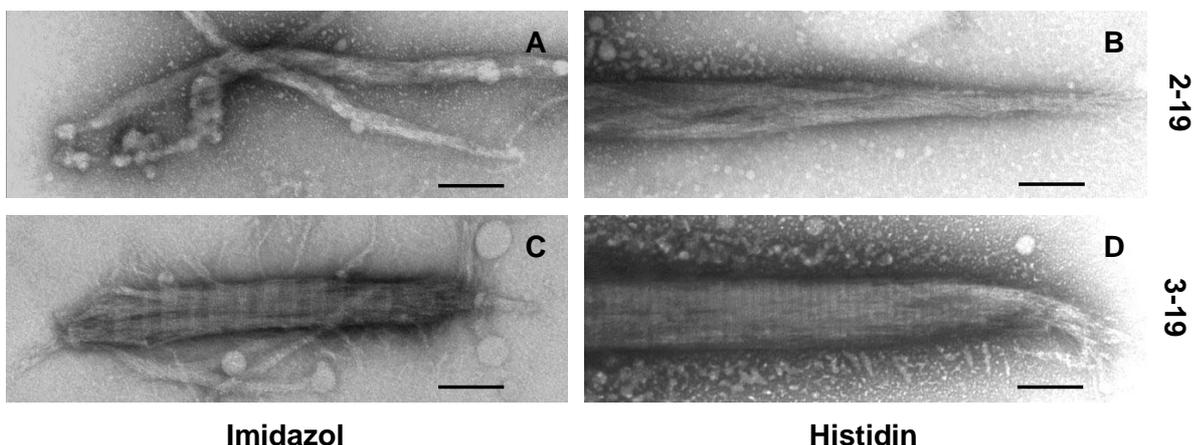


Abb. 3-21: Vergleich von Paramyosin-Koaggregaten kürzerer und längerer Fragmente in verschiedenen Puffern. Gradientendialyse gegen 150 mM KCl; 10 mM Imidazol/Histidin, pH 7,2; 2 mM MgCl₂; 0,02 % NaN₃. Balken = 100 nm

- A:** Aggregat des Kombinationsansatzes mit 2-19 in Imidazol-Puffer
- B:** Aggregat des Kombinationsansatzes mit 3-19 in Imidazol-Puffer
- C:** Aggregat des Kombinationsansatzes mit 2-19 in Histidin-Puffer
- D:** Aggregat des Kombinationsansatzes mit 3-19 in Histidin-Puffer

Daher wurde auch für diese Versuche das nahe verwandte Histidin eingesetzt, das ebenfalls bei der Aggregation isolierter Fragmente verwendet wurde (s. Kap. 3.7). Beim Vergleich der Abbildungen 3-21 B und D (Aggregate in Histidin-Puffer) mit den vorgenannten fällt der deutlich höhere Ordnungsgrad ins Auge. Die dargestellten Parakristalle der Kombinationsansätze der Fragmente 2-19 und 3-19 mit Paramyosin lassen eine 14,5 nm-Bänderung erkennen, die im Falle des kürzeren Fragmentes undeutlicher ausgeprägt ist, was auf die unebenmäßige Substrukturierung des Aggregats zurückzuführen ist. Die in Abb. 3-21 D dargestellte Form wird im Folgenden anhand der Abb. 3-22 B noch näher vorgestellt. Abb. 3-21 illustriert somit zwei Grundtendenzen: zum einen ist die strukturelle Integrität von Koaggregaten in Histidin-gepufferten Lösungen deutlich verbessert, zum anderen scheinen sich Mischkristalle mit längeren Fragmenten leichter zu höherem Ordnungsgrad ausformen zu können.

Einzelne Beispiele von Misch-Parakristallen mit unterschiedlichen Fragmenten in Histidin-Puffer sind in Abb. 3-22 dargestellt. Die Präsentation beschränkt sich auf Einzelbeispiele, da die Misch-Parakristalle unabhängig vom zugegebenen Fragment-Typ von äußerst polymorpher Natur sind, wie aus Abb. 3-22 A ersichtlich. Generell ist festzustellen, dass sie in Längsrichtung scharf begrenzt sind, während die Enden zumeist gespleißt erscheinen. Die beobachteten Bänderungsmuster sind sehr uneinheitlich und variieren von einer deutlich ausgeprägten Grundperiode von 14,5 nm (Abb. 3-22 B) bis hin zu sehr kompliziert erscheinenden Formen wie in Abb. 3-22 C. Dabei ändert sich die Querstreifung sowohl in lateraler als auch in longitudinaler Richtung entlang der Koaggregate. Dementsprechend sind auch die korrespondierenden Fourier-Transformationen sehr vielgestaltig, jedoch können Grundeigenschaften festgestellt werden, die wiederum unabhängig vom verwendeten Fragment zu sein scheinen: Ordnungen von 14,5 nm erscheinen bis hinauf zur vierten bei deutlicher Betonung der ersten und dritten Ordnung auf dem Meridian.

Alle übrigen Beugungsreflexe sind meist nicht auf dieser Achse zentriert und neigen zur Ausbildung von Linien oder *off*-meridionalen Reflexen. Sie können als Obertöne der Paramyosin-spezifischen Periode von 72,5 nm interpretiert werden, wobei sich die gefundenen Abstände auf die Ordnungen 2, 3, 6, 8, 12 und 17 konzentrieren. Auch diese Beobachtung ist in Abb. 3-22 eingebunden (Markierungen innerhalb der FFTs).

Abb. 3-22 D zeigt ein nur sehr selten zu findendes Exemplar eines Mischkristalls von 2-19 mit Paramyosin, das sich durch seinen vergleichsweise hohen Ordnungsgrad von den gewöhnlich zu findenden Aggregaten (s. Abb. 3-21 B) unterscheidet. Wie auch bei den Paramyosin-Koaggregaten der längeren Fragmente sind in der entsprechenden FFT Ordnungen von 72,5 nm zu erkennen, die die Beteiligung von Paramyosin demonstrieren. Generell scheinen jedoch kürzere Fragmente eine geringere Tendenz zur Ausbildung hoch geordneter Mischkristalle mit Paramyosin aufzuweisen.

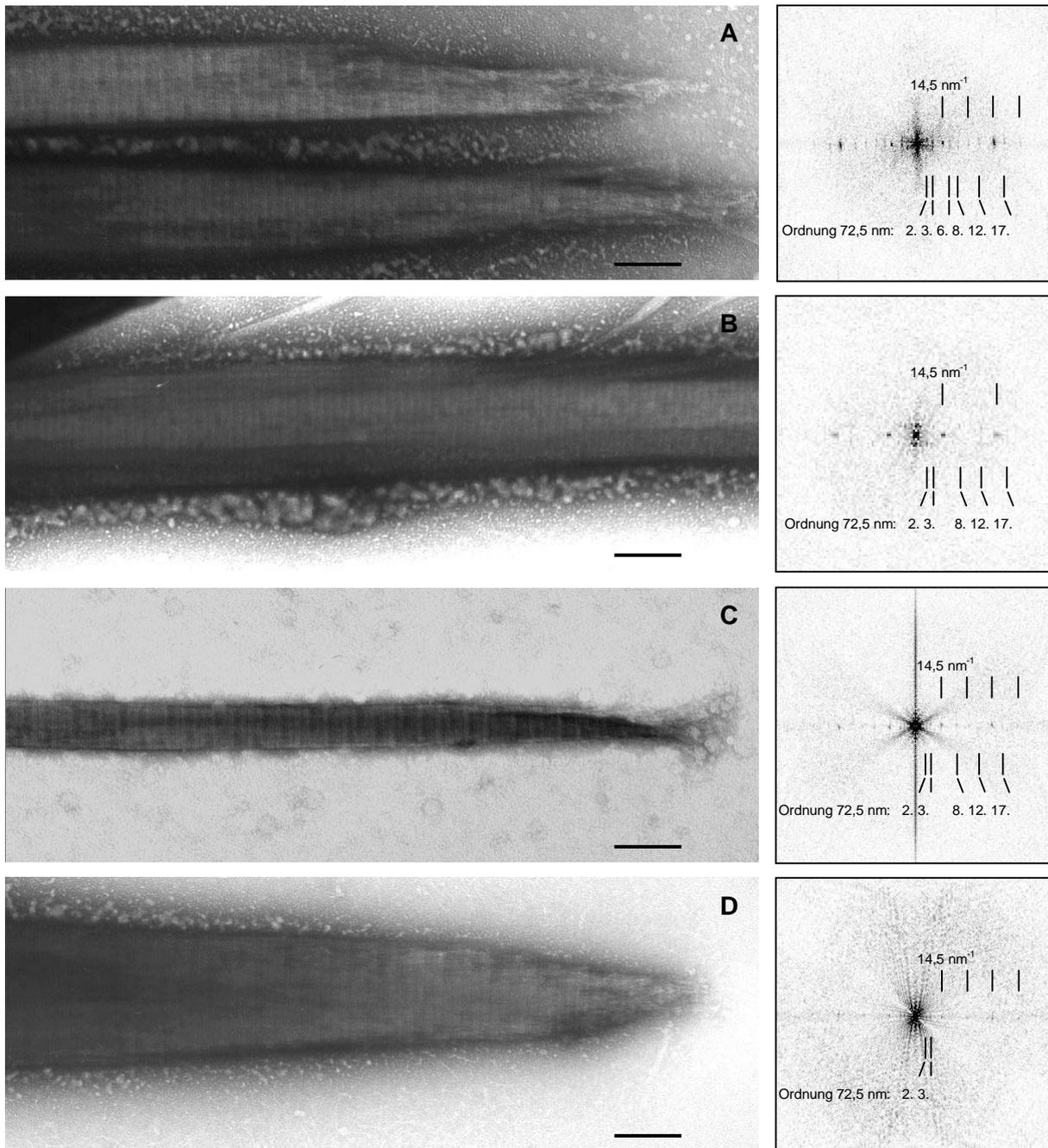


Abb. 3-22: Koaggregate verschiedener Fragmente mit Paramyosin (Histidin-Puffer: s. Abb. 3-21; Balken = 100 nm; molares Verhältnis der Proteine im Aggregationsansatz = 1:1)

- A:** 3-19 + Paramyosin
- B:** 3-19 G + Paramyosin
- C:** 3-1 + Paramyosin
- D:** 2-19 + Paramyosin

3.7 Fragment-Aggregate

LMM ist als der aggregationsfähige Teil des Myosinmoleküls in der Lage, sich in Lösungen niedriger Ionenstärke zu geordneten Strukturen zusammenzulagern. Von der elektronenmikroskopischen Analyse solcher meist parakristalliner Aggregate, die sehr unterschiedliche Formen annehmen können, erhofft man sich Rückschlüsse auf die Filamentstruktur. Bedingt durch die Zusammensetzung der Lösung, die Art der Absenkung der Ionenstärke und die Lokalisierung des LMM-Abschnittes werden bestimmte intramolekulare Interaktionen bevorzugt, so dass sich charakteristische Muster ausbilden. Diese können über die Technik der Negativkontrastierung dargestellt werden. Die Periodizitäten der entstehenden Motive sind dabei in der Regel integrale Vielfache des Köpfchenabstandes der dicken Filamente. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene Arten von Perioden erhalten, die im Folgenden nach Klassen unterschieden werden. Generell kann festgestellt werden, dass sich in einer Einzelpräparation (eines bestimmten Fragmentes unter spezifischen Aggregationsbedingungen) überwiegend oder ausschließlich Aggregate eines bestimmten Typs finden lassen, die Präparate also als nahezu homogen zu bezeichnen sind. Ein Polymorphismus von Aggregationsmustern ist in Abhängigkeit vom gewählten Verfahren zur Absenkung der Ionenstärke vor allem für das Fragment 2-19 zu beobachten.

3.7.1 Aggregate mit einer 43,5 nm-Periodizität

Parakristalle mit einer Periode von 43,5 nm entstehen mit den Fragmenten 3-19 und 3-19G nach langsamer Dialyse gegen Histidin-Puffer. Beispiele hierfür sind in Abb. 3-23 dargestellt. Eine Grundeigenschaft aller beobachteten spindel- bis nadelförmigen Parakristalle dieses Typs wird in der Darstellung offensichtlich: Das Grundmotiv setzt sich nicht über die gesamte Breite des Aggregats fort. Das in Abb. 3-23 A dargestellte Exemplar zeigt, wie das im Ausschnitt vergrößerte, spiegelsymmetrische Muster in den axialen Flanken zu beobachten ist, jedoch um einen Betrag von 14,5 nm gegeneinander versetzt (Pfeile). Das Muster wird dominiert von einem dunklen, 27 nm einnehmenden Bereich, der beiderseitig von einer 4,5 nm breiten, hellen Bande eingerahmt wird. Den Abschluss der Periode bildet ein dunkler Streifen von 7,5 nm Breite. Im Zentrum des Parakristalls gehen die beiden Muster graduell ineinander über. Ein in dieser Hinsicht noch extremeres Beispiel stellt die in Abb. 3-23 B gezeigte Spindel eines 3-19G-Aggregats dar. Das Grundmuster ist nur noch sehr punktuell zu beobachten, während sich über den gesamten Parakristall Superpositionsmuster ausbilden.

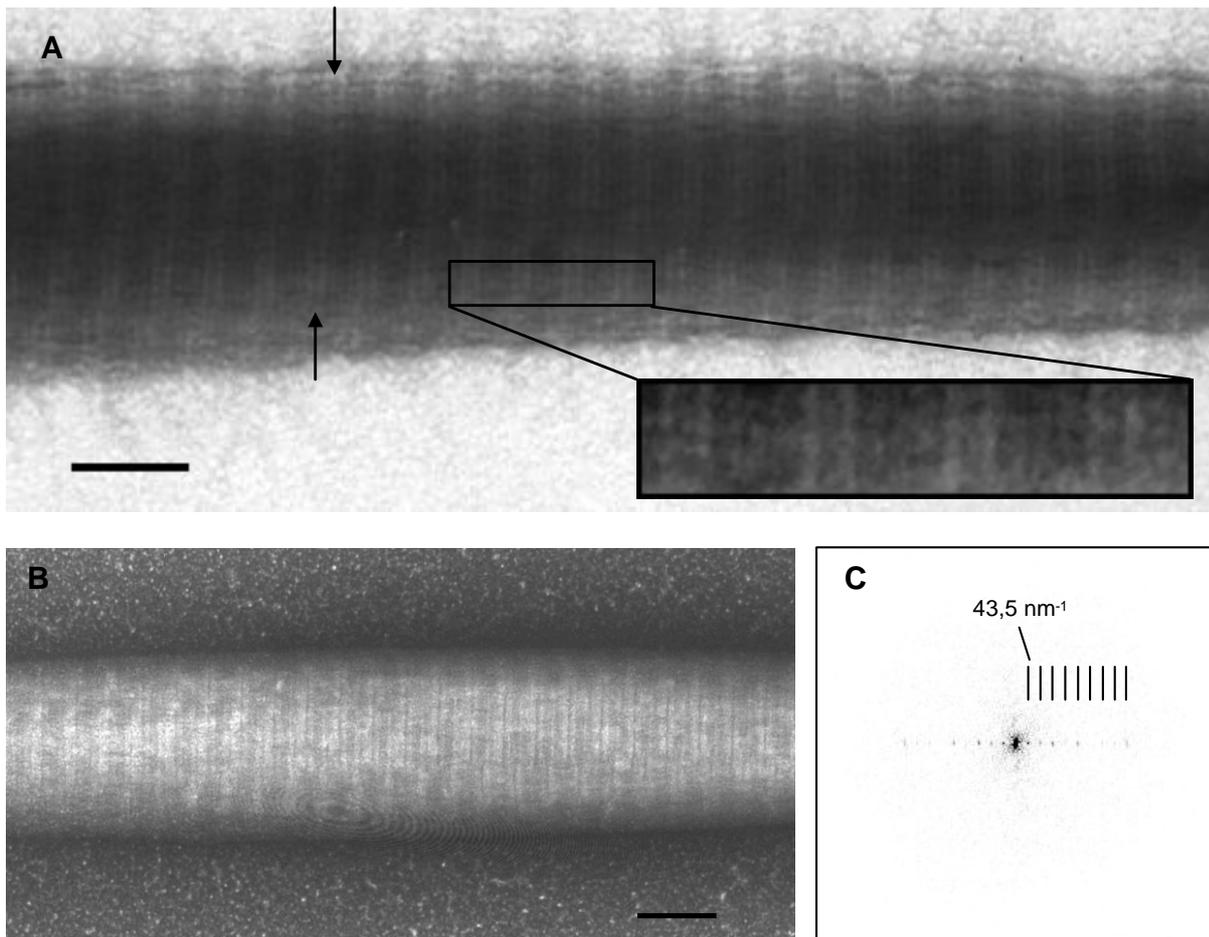


Abb. 3-23: 43,5nm-periodische Parakristalle

- A:** Parakristall von **3-19** nach Gradientendialyse gegen 150 mM KCl; 10 mM Histidin, pH 7,2; 2 mM $MgCl_2$; 0,02 % NaN_3 ; Balken = 100 nm. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt einen ca. 3,5 Perioden umspannenden Bereich, die Pfeile markieren die über die Breite des Parakristalls zu beobachtende Musterverschiebung um 14,5 nm
- B:** Parakristall von **3-19 G** nach Gradientendialyse gegen 150 mM KCl; 10 mM Histidin, pH 7,2; 2 mM $MgCl_2$; 0,02 % NaN_3 ; Balken = 100 nm
- C:** **Fourier-Transformation** eines Ausschnittes dieses Typs; die Linien markieren den axialen Netzebenenabstand von 43,5 nm und dessen höhere Ordnungen.

Da die Bereiche, in denen das im Ausschnitt dargestellte Motiv in reiner Form vorliegt, sehr eng begrenzt sind, werden von Fourier-Transformationen selbst bei kleinst möglicher auswertbarer Rahmengröße immer Überschneidungsbereiche erfasst; damit ist es nicht möglich, auf dieses Muster zu filtern. Die Fourier-Transformation ist hier also nur dazu gedacht, die trotz allem hohe Regelmäßigkeit der 43,5 nm-Periode zu demonstrieren. Zusammenfassend kann also für die Parakristalle diese Typs eine echte Homogenität nicht reklamiert werden, jedoch scheinen sich die unterschiedlichen Ausprägungen auf ein gemeinsames Grundmotiv zurückführen zu lassen.

3.7.2 Aggregate mit einer Grundperiode von 14,5 nm

Die am häufigsten beobachtete Periodizität in Parakristallen wie auch in Schichtkristallen ist die des Köpfchenabstandes in Filamenten von 14,5 nm. Sie wurde in Präparaten der Fragmente 2-1, 2-18, 2-19 (Einzelfall in Imidazolpuffer), 3-1, 3-18 und 3-19 (Imidazolpuffer) gefunden. In den wenigen Fällen, in denen flächige Anordnungen auf Lipidmonolayern erhalten werden konnten, lag ebenfalls ein solcher Wiederholungsabstand zugrunde. Dabei scheinen die Fragmente, die den C-terminalen Exon 19-Abschnitt aufweisen, eine geringere Tendenz zur Ausbildung eines solchen Grundmusters im standardmäßig verwendeten Histidin-Puffer zu haben. Die vier Fragmente, denen dieser Abschnitt fehlt, bilden im genannten Puffersystem nach Dialyse vorzugsweise extrem dichte und kompakt erscheinende Parakristalle, die oft über die gesamte Länge von Schwermetall dunkel gefärbt erscheinen (nicht dargestellt). Bereiche, in denen ein Bänderungsmuster zu erkennen ist, sind dann auf die Enden der Parakristalle beschränkt. An Einzelfällen kann jedoch eine eindeutige Zuordnung zu dem hier zu charakterisierenden Typ vorgenommen werden. Teilweise, speziell in Präparaten des Fragments 3-18 sind Objekte zu beobachten, die durch ihre Scharfkantigkeit in (mindestens) zwei Dimensionen an Kristalle erinnern. Die angewendete Technik erlaubte jedoch eine weitergehende Analyse nicht. Diese Strukturen sind tiefschwarz von Uranylacetat durchdrungen und erleiden innerhalb von kürzester Zeit Strahlungsschäden.

Bei rein optischer Analyse der in Abb. 3-24 A und C dargestellten 14,5 nm-Musters entsteht der Eindruck eines mäanderförmigen Wechsels dunkler und heller Zonen von ähnlicher Ausdehnung in axialer Richtung (Längsachse der Parakristalle ist horizontal), wobei die Kontrastunterschiede relativ gering ausfallen. Die in B und D dargestellten FFTs, die nennenswerte Intensitäten nur bei ungeraden Ordnungen der Periode aufweisen, wurden durch Filterung auf die meridionalen Ordnungen von 14,5 nm zur Erstellung der Dichteverteilung in den eingebundenen Graphiken („insets“) herangezogen. Die Darstellung demonstriert, dass ein identisches Färbungsprofil bei Verwendung N-terminal unterschiedlicher Fragmente erhalten werden kann. In den hier gezeigten Beispielen für die Fragmente 2-19 und 3-19 ergibt sich durch die Filterung ein viergeteilter Färbungsverlauf, der die Periode von 14,5 nm in jeweils einen ca. 2,5 nm breiten, dunklen und hellen Streifen mit dazwischenliegenden Bereichen mittlerer Farbtiefe einteilt. Das annähernd als sinusoid zu bezeichnende Muster ist deutlich spiegelsymmetrisch.

Darüber hinaus konnte jedoch festgestellt werden, dass diese durch Filterung gewonnene Dichteverteilung in unterschiedlichen Objekten einer Präparation trotz optisch großer Ähnlichkeit durchaus variieren kann. Dieser Effekt wird durch Abb. 3-25 anhand zweier Parakristalle von 3-19-Fragmenten dokumentiert. Eine ähnliche Aufnahme, an der analoge Effekte ausgewertet wurden, konnte von 3-18-Fragmenten nach Mehrschritt-dialyse angefertigt werden (nicht dargestellt).

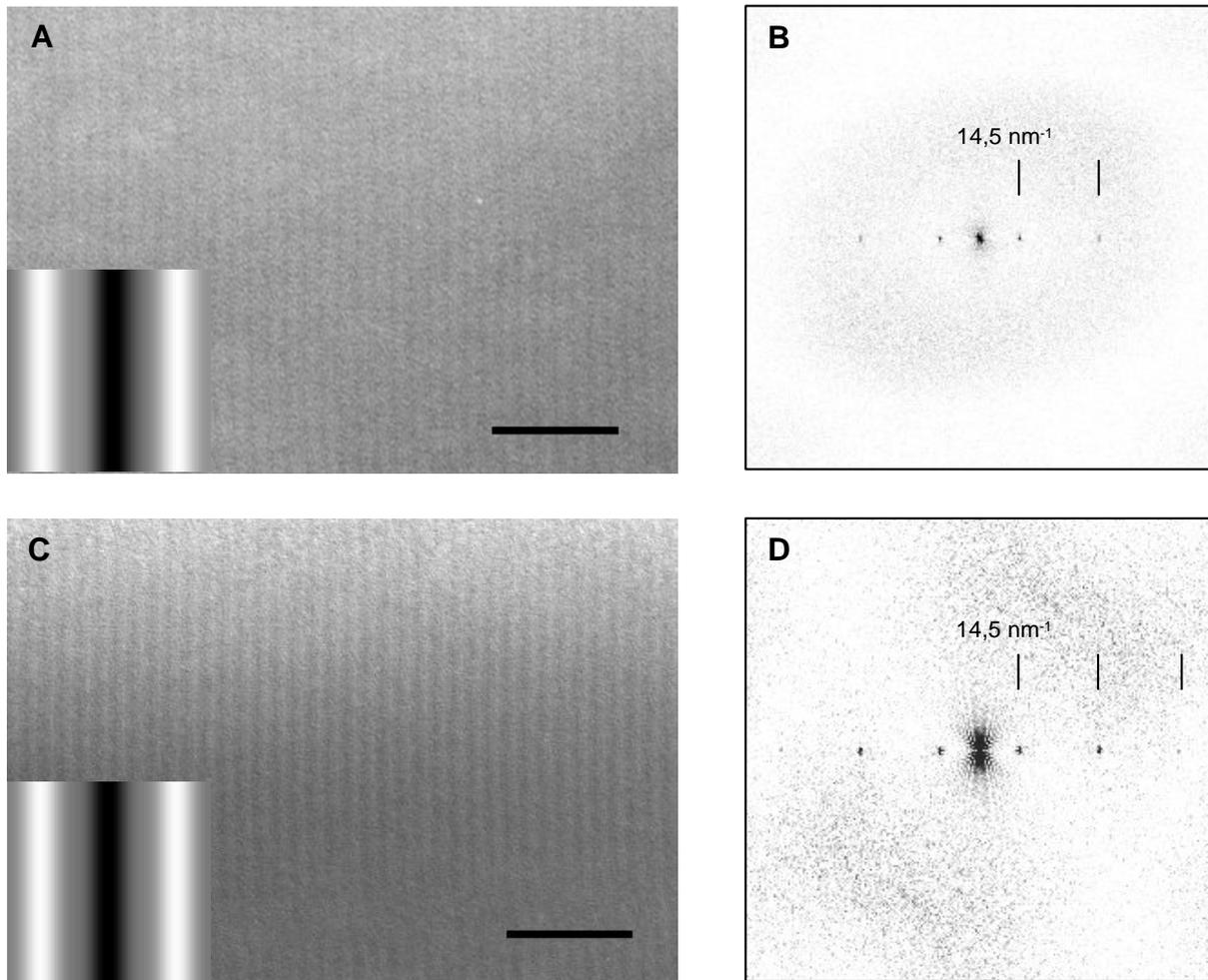
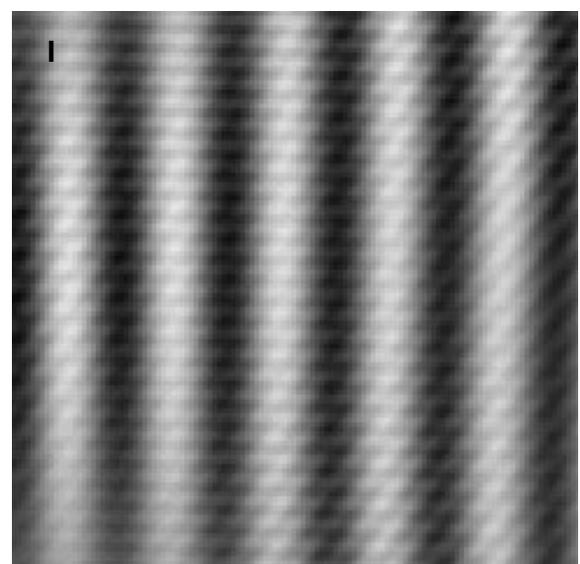
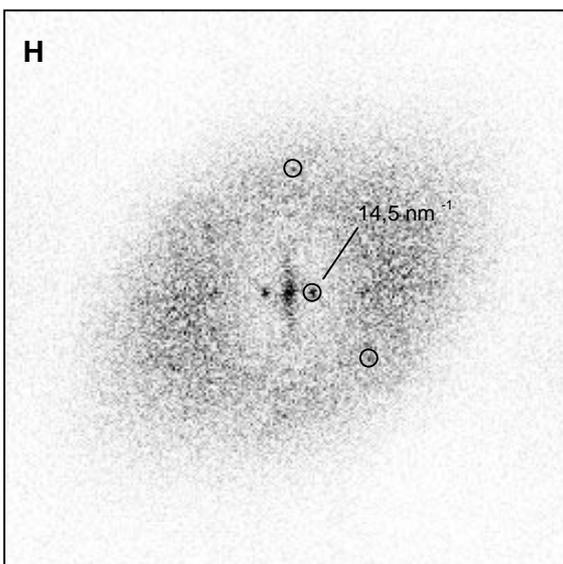
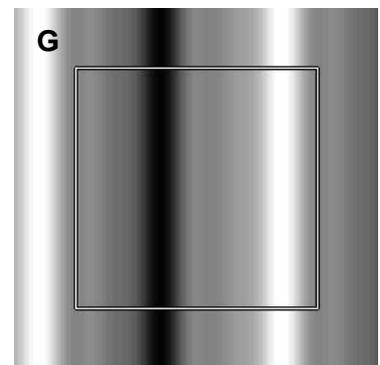
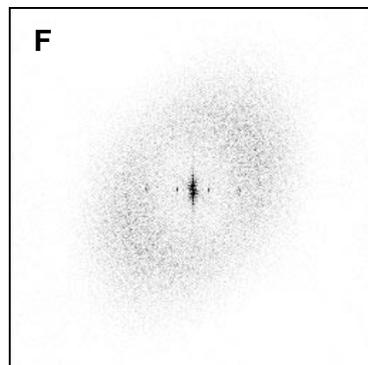
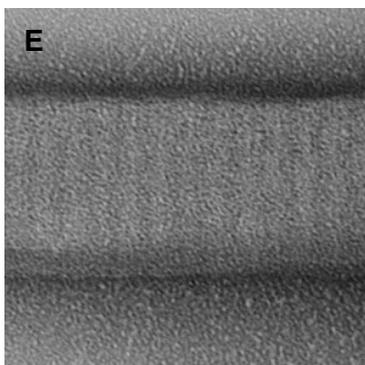
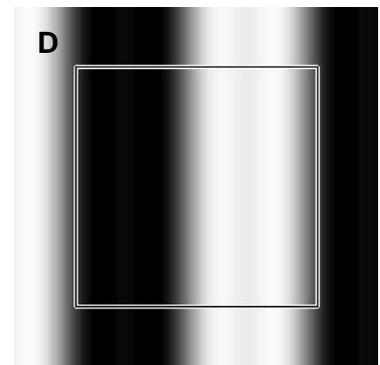
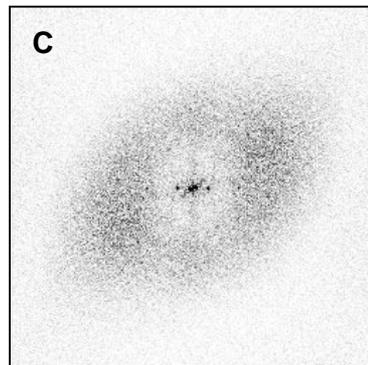
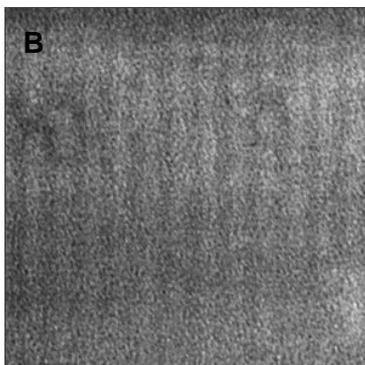
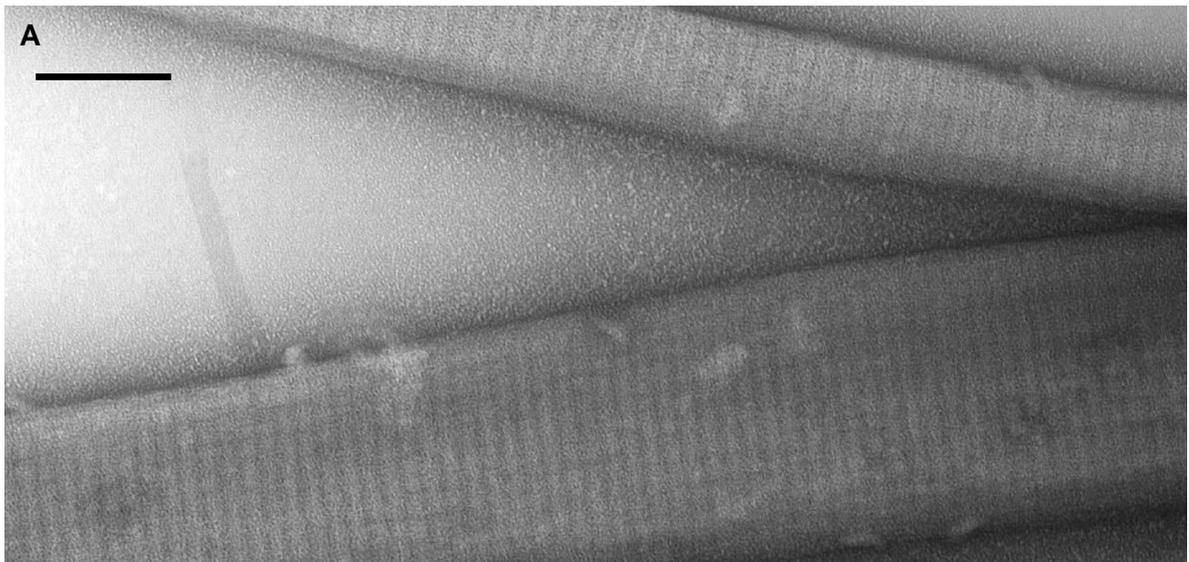


Abb. 3-24: 14,5 nm-Periode: axiale Musterbildung durch die Fragmente 2-19 und 3-19

- A:** Ausschnitt aus einem Parakristall von **2-19**-Fragmenten nach Mehrschrittddialyse (50 mM KCl; 10 mM Imidazol, pH 7,2; 2 mM MgCl₂; 0,02 % NaN₃). Längsachse des Parakristalls horizontal, Balken = 100 nm. Inset: Dichteverteilung der 14,5 nm-Periode durch Filterung auf 14,5nm-Ordnungen aus:
- B: FFT von A;** Gitterabstände von 14,5 nm und der 3. Ordnung davon sind markiert
- C:** Ausschnitt aus einem Parakristall von **3-19**-Fragmenten nach Mehrschrittddialyse (50 mM KCl; 10 mM Imidazol, pH 7,2; 2 mM MgCl₂; 0,02 % NaN₃). Längsachse des Parakristalls horizontal, Balken = 100 nm. Inset: Dichteverteilung der 14,5 nm-Periode durch Filterung auf deren Ordnungen aus:
- D: FFT von C;** Gitterabstände von 14,5 nm bzw. der 3. und 5. Ordnung davon sind markiert

Abb. 3-25: 14,5 nm-Periode: unterschiedliche Feinstruktur in Aggregaten von 3-19-Fragmenten

- A: Übersicht** über zwei benachbarte Parakristalle von 3-19 nach SDP in 50 mM KCl; 10 mM Imidazol, pH 7,2; 2 mM MgCl₂; 0,02% NaN₃. Balken = 100 nm
- B: Ausschnitt-Vergrößerung** aus dem breiten Parakristall in A
- C: FFT von B;** Reflexionen nahe des Ursprungs entsprechen dem 14,5 nm-Abstand
- D: Filterung aus C** auf meridionale Ordnungen von 14,5 nm; Kantenlänge der Box: 14,5 nm
- E: Ausschnitt-Vergrößerung** aus dem schmalen Parakristall in A
- F: FFT von E;** dimensioniert wie C
- G: Filterung aus F** auf meridionale Ordnungen von 14,5 nm; Kantenlänge der Box: 14,5 nm
- H: FFT** eines Ausschnitts des breiten Parakristalls mit Beugungspunkten in 2 Dimensionen; Filterung auf die eingekreisten Reflexionen ergeben die Rekonstruktion in:
- I: Bildrekonstruktion** nach Filterung auf die 3 in H markierten Beugungspunkte (Maskengröße: 2 Pixel); dargestellt sind 4,5 Perioden



Die Übersicht in Abb. 3-25 A zeigt zentrale Abschnitte nadelförmiger Parakristalle, wobei insbesondere beim Vergleich der Ausschnitte in B und E ersichtlich wird, dass die jeweiligen Feinmuster optisch kaum voneinander unterscheidbar sind. Die aus den 14,5 nm-Ordnungen erstellten Dichteverteilungen zeigen jedoch deutliche Unterschiede: In D, der Rekonstruktion des breiteren Exemplars, ergibt sich ein nahezu zweigeteiltes Muster mit 2-2,5 nm schmalen Übergangsbereichen mittlerer Graustufe (der helle Abschnitt weist zudem einen zentralen "Nadelstreifen" auf).

Die Bereiche extremer Färbung sind in Abb. 3-25 G (schmaler Parakristall) auf ca. 1,7 nm begrenzt. Hier nehmen mittlere Graustufen mit leichten Dichtemodulationen den Rest der Periode ein. Beide Motive sind ebenfalls spiegelsymmetrisch und können als Abwandlungen aus den in Abb. 3-24 dargestellten Mustern beschrieben werden, indem sich im einen Fall die Zonen maximaler Graustufenintensität auf Kosten der Banden mittlerer Intensität verbreitern, im anderen verschmälern.

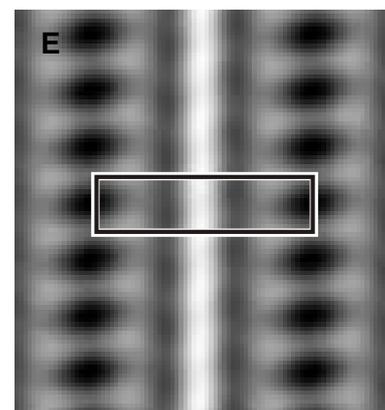
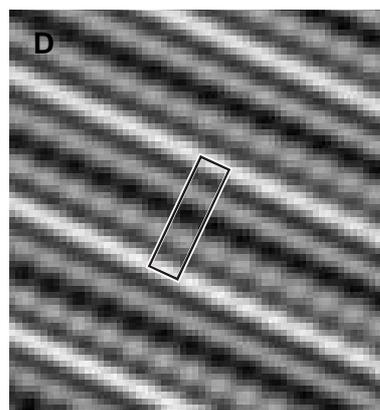
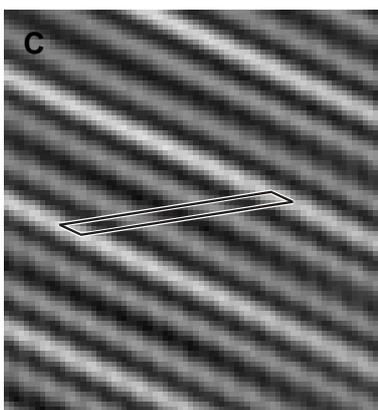
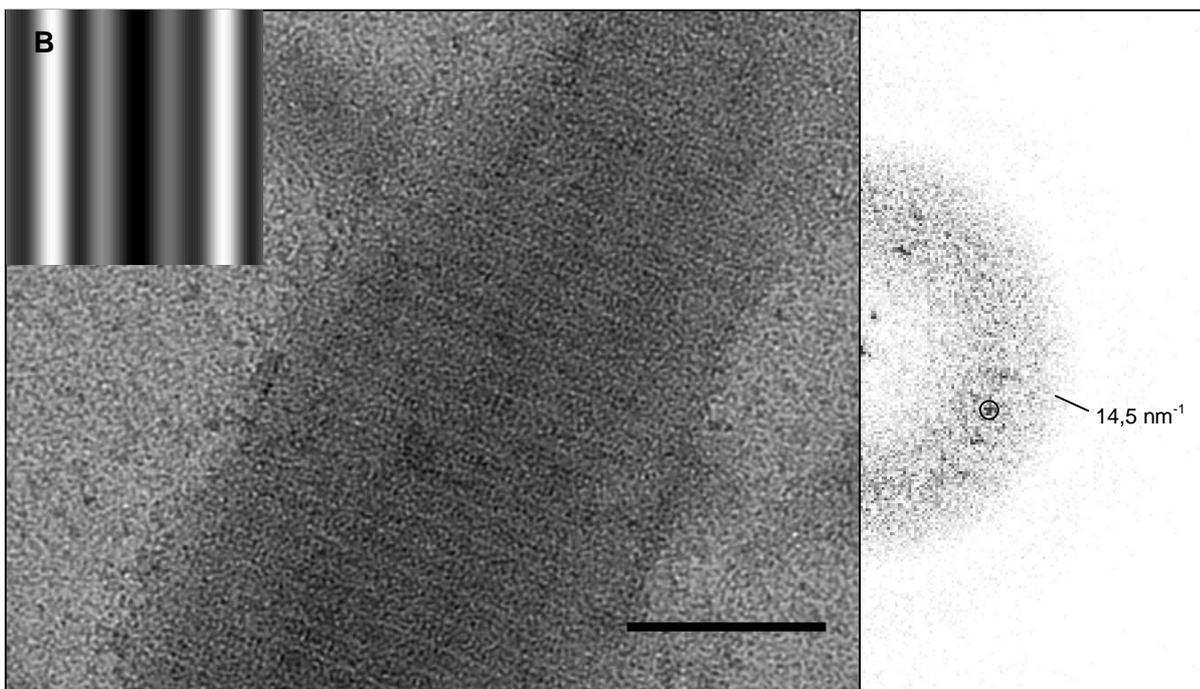
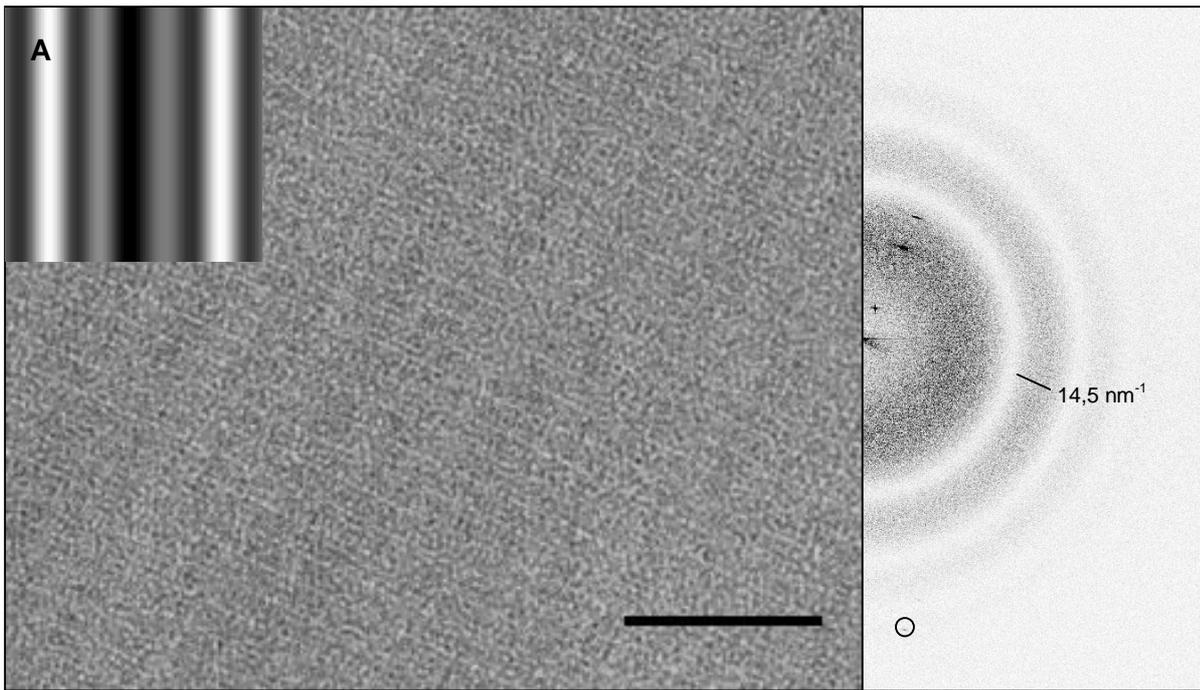
Bei eingehender Betrachtung der Fourier-Transformation in Abb. 3-25 C können weitere Beugungsreflexionen in der Fläche der FFT ausgemacht werden. Es handelt sich hierbei nicht in allen Fällen um zufällig auftretende Intensitätsschwankungen, einige können über einen begrenzten Bereich des breiteren Aggregats wiederholt in mehreren Transformationen beobachtet werden. Allerdings stellt sich auch in diesem Ausschnitt eine gewisse Variabilität des Beugungsmusters ein. Neben dem prominenten 14,5 nm-*spot* wurden reproduzierbar zwei weitere Reflexe beobachtet; eine entsprechende FFT ist in Abb. 3-25 H abgebildet. Diese drei Intensitäten wurden zur Rekonstruktion in Abb. 3-25 I verwendet. Der äußerste, nahezu äquatorial positionierte Beugungspunkt verursacht dabei eine horizontal verlaufende Dichtemodulation im Abstand von 2,9 nm. Die Anwesenheit von Reflexen in zwei Dimensionen der FFT deutet eine lokale flächige Ordnung der Moleküle an, d.h. es fließen hier auch Anteile ein, die mit der lateralen Assoziation der LMM-Stäbe in Verbindung stehen. Allerdings sind lediglich drei Reflexe nicht ausreichend, um die wahre Einheitszelle mit hinreichender Sicherheit zu bestimmen.

Weitere Informationen zu diesem fundamentalen Wiederholungsmotiv bietet die Auswertung von Schichtanordnungen auf Lipidmonolayern. Im Gegensatz zur Analyse von Parakristallen, in denen die 3-dimensionale Anordnung nicht ohne weiteres nachvollzogen werden kann und die nicht-axiale Ordnung oft nur schwach ausgeprägt ist, hat man unter Verwendung dieser Technik die Möglichkeit, eine Assoziation von Molekülen oder Substrukturen in der Ebene zu induzieren. Man erhöht somit drastisch die Wahrscheinlichkeit, Charakteristiken der seitlichen Zusammenlagerung zu erfassen. Allgemein überwiegt unter den hier gewählten Bedingungen bei allen Fragmenten ein eher faserig erscheinendes Gesamtbild von schwach kontrastierten Strukturen. Diese sind nur lose assoziiert und lassen keinerlei Periodizität erkennen (nicht dargestellt). Gelegentlich sind auch in diesen Präparaten Aggregate von pa-

rakristallinem Charakter zu beobachten, in denen offensichtlich kein schichtartiger Aufbau vorliegt (s. Abb. 3-27 in Kap. 3.7.3). Es konnten jedoch einige Objekte gefunden werden, die eine hinreichende Organisation aufwiesen. Bei den in Abb. 3-26 dargestellten Anordnungen handelt es sich um Exemplare, die mit Fragmenten ohne den durch Exon 19 kodierten C-Terminus erhalten werden konnten.

In diesen Schichtanordnungen (Abb. 3-26 A und B) wird die 14,5 nm Periode bei insgesamt schwacher Kontrastierung durch eine hier im Winkel von ca. 25° zur Horizontalen verlaufende helle Streifung betont. Im Unterschied zu den bisher beschriebenen Mustern ist ein offensichtlicher Hell-Dunkel-Wechsel hier nicht zu beobachten. Folgerichtig unterscheidet sich auch die meridionale Beugungscharakteristik von den oben beschriebenen durch die Anwesenheit einer deutlichen Intensität in der 4. Ordnung der Periode, es tauchen also nicht mehr lediglich ungerade Ordnungen auf. Die relativen Intensitäten auf den jeweiligen Ordnungen zeigen deutliche Parallelen, indem sich die Hauptintensität auf der dritten Ordnung wiederfindet, die 2. Ordnung dagegen nur schwach bis verschwindend ausgeprägt ist. Konsequenterweise ergibt die Filterung auf die Obertöne der Grundperiode (*insets* in Abb. 3-26 A und B) ein fast deckungsgleiches Bild und zeigt keinen sinusoiden Verlauf, sondern ist durch zusätzliche Färbungen modifiziert. Prinzipiell ist in den ebenfalls spiegelsymmetrischen Mustern wiederum je eine Zone extremer Farbtiefe in der Halbposition der Periode zu beobachten, während mittlere Grautöne den Rest der Periode dominieren. Jedoch ist hier in beiden Fällen der helle Bereich von dunklen Streifen eingerahmt. Der wechselnde Farbverlauf macht eine eindeutige Bestimmung der Ausdehnung der einzelnen Zonen schwierig. Die dunklen Streifen beiderseits der markanten, hellen Zone scheinen jedoch mit annähernd 2 nm Breite vergleichsweise schmaler, während die übrigen eher auf einen Wert von 2,5 nm Breite einzustufen sind.

An sehr unterschiedlichen Stellen tauchen in den korrespondierenden FFTs Beugungsintensitäten auf, die eine laterale Ordnung innerhalb der Schichtanordnungen anzeigen. Sehr schwach ist dieser Reflex im Falle des 2-18-Fragments ausgeprägt und markiert zusammen mit der Hauptperiode eine Einheitszelle der Dimensionen $a = 2,95 \text{ nm}$; $b = 25,9 \text{ nm}$; $\gamma = 33,9^\circ$. Die Einheitszelle für das längere Fragment 3-1 ist orthogonal, d. h. der Beugungsreflex liegt hier auf dem Äquator bei einem Abstand von 3,8 nm (Einheitszelle: $a = 3,8 \text{ nm}$, $b = 14,5 \text{ nm}$, $\gamma = 90^\circ$). Diese Dichteverteilung ist deutlich ausgeprägt; das belegt die Anwesenheit multipler Reflexe auf dem entsprechenden Gitter. Die Rekonstruktionen in Abb. 3-26 C und D visualisieren die Orientierung der Einheitszellen vor dem Hintergrund der durch den entsprechenden Reflex hervorgerufenen Dichteverteilungen. Dabei wird in der 2-18-Filterung (Abb. 3-26 C) demonstriert, wie die 2,95 nm-Kante im rechten Winkel zur "axialen" Periode von 14,5 nm orientiert ist.



Auch wird hier offensichtlich, dass diese Dichteverteilung nicht über eine größere Fläche in gleicher Regelmäßigkeit ausgeprägt ist. Oben links im gewählten Ausschnitt beginnt das gefilterte Gitter zu verschwimmen. Diese Unschärfe schwächt den entsprechenden Beugungspunkt ab. Bezieht man hingegen alle Gitterintensitäten der klarer definierten 3-1-Einheit zelle mit ein, so bevorzugt das kristallographische Programm eine p2-Symmetrie innerhalb der Zelle. Diese setzt eine 2fache Rotationssymmetrie voraus, wie in Abb. 3-26 E nachvollzogen werden kann.

3.7.3 Aggregate mit 58 nm-Charakteristiken

Die bis hierher für Fragment-Aggregate beschriebenen Perioden des fundamentalen Köpfchenabstandes von 14,5 nm und dessen Dreifachem können als echte axiale Wiederholungen eingestuft werden, indem die entsprechenden Reflexe in fibrösen Parakristallen auf dem Meridian der FFT lokalisiert sind. Darüber hinaus kann in Aggregaten des Fragments 2-19 unter verschiedenen Bedingungen eine 58 nm-periodische Eigenschaft beobachtet werden. Im Folgenden soll dieses Phänomen anhand zweier Beispiele näher beschrieben werden. Zunächst ist festzuhalten, dass dieses Charakteristikum niemals unabhängig von einer gleichzeitig das Erscheinungsbild wie auch die korrespondierende FFT beherrschenden 14,5 nm-Grundperiode beobachtet wurde. Es äußert sich in einer schwach ausgeprägten, eher als diffus zu bezeichnenden Kontrastmodulation innerhalb von Parakristallen, die unter Anwendung unterschiedlicher Methoden erhalten wurden. Als Einzelfall wurde in einem Lipid-Monolayer-Experiment ein parakristallines Exemplar gefunden (Abb. 3-27), das als eine Art Hybrid die Verwandtschaft mit dem in Kapitel 3.7.2 beschriebenen 14,5 nm-Motiv aufzeigt. Weitere Beispiele wurden nach Gradientendialyse in Imidazolpuffer (nicht dargestellt)

Abb. 3-26: Schichtanordnungen der Fragmente 2-18 und 3-1 auf Lipidmonolayern

A: flächige Anordnung von **2-18**-Fragmenten und korrespondierende Halb-FFT.

Probennahme nach 1 Tag eines Ansatzes von 0,12 mg/ml Fragment in Lipidaggregationspuffer, 5 % PEG, 30 % Lipid. Balken = 100 nm. Inset: Dichteverteilung über die 14,5 nm-Periode durch Filterung auf deren meridionale Ordnungen. Der 2-dimensionale Beugungsreflex, der zur Anfertigung der Rekonstruktion in C benutzt wurde (Kreis), sowie der Gitterabstand von 14,5 nm sind in der FFT markiert.

B: flächige Anordnung von **3-1**-Fragmenten und korrespondierende Halb-FFT.

Probennahme nach 1 Tag eines Ansatzes von 0,1 mg/ml Fragment in Lipidaggregationspuffer, 5 % PEG, 30 % Lipid. Balken = 100 nm. Inset: Dichteverteilung über die 14,5 nm-Periode durch Filterung auf deren meridionale Ordnungen. Der äquatoriale Beugungsreflex im Abstand von ca. 3,8 nm, der zur Anfertigung der Rekonstruktion in D benutzt wurde (Kreis), sowie der Gitterabstand von 14,5 nm sind in der FFT markiert.

C: Bildrekonstruktion aus A: Filterung unter Einbeziehung der 14,5 nm-Ordnungen und des in der entsprechenden FFT markierten Reflexes. Darstellung der von diesem und der Hauptperiode gebildeten Einheitszelle: $a = 2,95 \text{ nm}$, $b = 25,9 \text{ nm}$, $\gamma = 33,9^\circ$

D: Bildrekonstruktion aus B: Filterung unter Einbeziehung der 14,5 nm-Ordnungen und des in der entsprechenden FFT markierten äquatorialen Reflexes mit Darstellung der von diesem und der Hauptperiode gebildeten Einheitszelle: $a = 3,8 \text{ nm}$, $b = 14,5 \text{ nm}$, $\gamma = 90^\circ$

E: p2-Dichteverteilung der in D ausgewiesenen Einheitszelle unter Einbeziehung aller Gitterpunkte

und nach SDP in Imidazolpuffer (Abb. 3-28) beobachtet, wobei die jeweilige Parakristallform dann den ausschließlich im Präparat vorzufindenden Aggregationstyp darstellt, eine 58 nm-Periodizität aber nur lokal (Pfeilspitzen in Abb. 3-27 A) oder in bestimmten Parakristallen ausgeprägt ist.

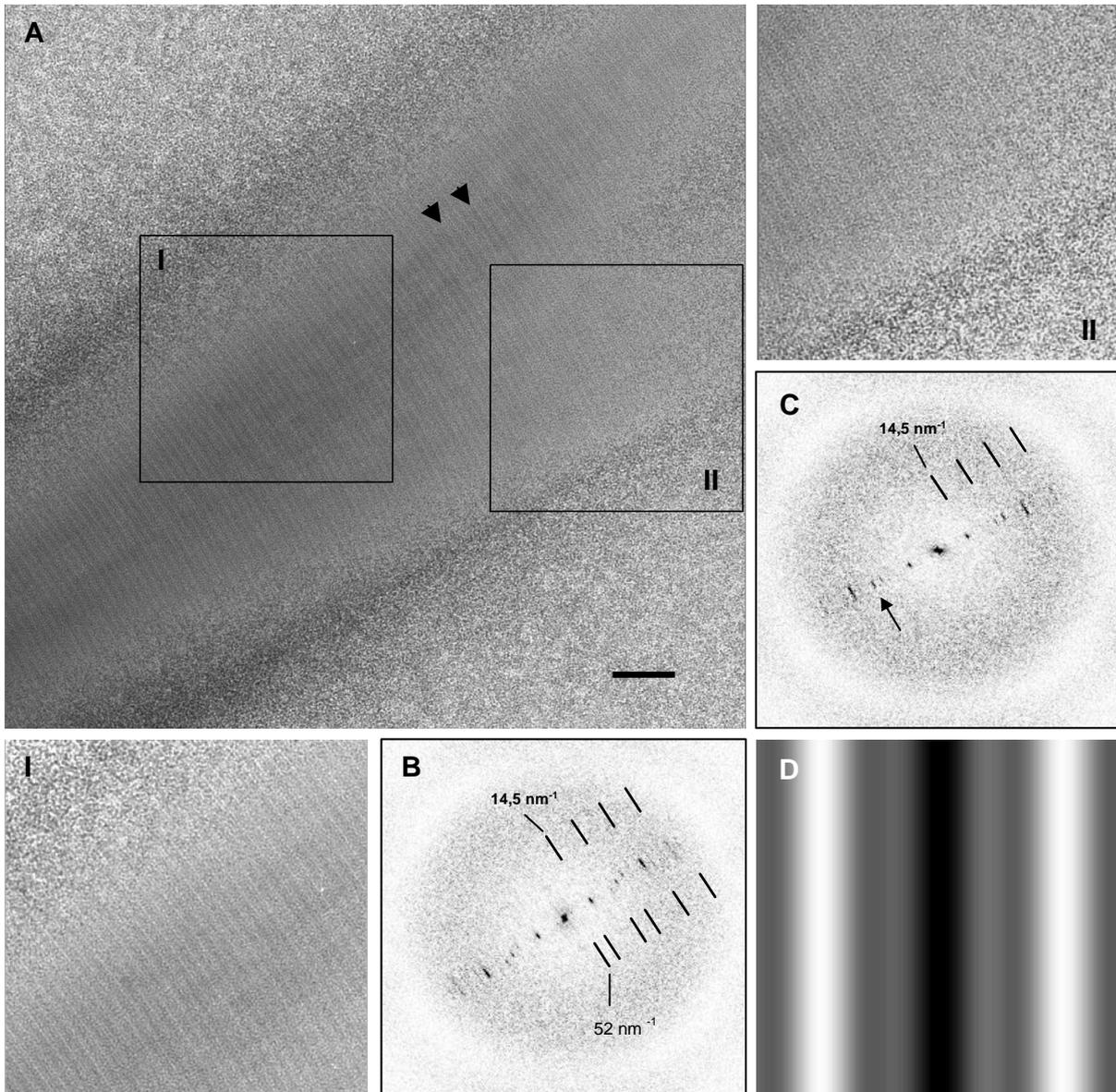


Abb. 3-27: Parakristall von 2-19 auf einem Lipid-Monolayer

A: Übersicht über das Aggregat aus einem Ansatz in Lipidaggregationspuffer mit 5 % PEG und 30 % Lipid (Probenentnahme nach einem Tag bei einer Proteinkonzentration von 0,7 mg/ml). Balken = 100 nm; die Ausschnittbereiche I und II, die zur Erstellung der FFTs in B respektive C verwendet wurden, sind eingezeichnet; die Pfeilspitzen markieren Abstand und Richtung der periodischen Färbungsmodulation.

B: FFT aus Bereich I; Die Markierungen weisen Gitterabstände der Ordnungen von 14,5 nm aus (oben), sowie weitere Ebenen, auf denen Beugungsintensitäten gefunden wurden (unten, die auf 4,833 nm kalibrierten Realabstände sind aus Tab. 3-6 zu entnehmen).

C: FFT aus Bereich II mit 14,5 nm-Ordnungen; der Pfeil weist auf eine fast meridionale Beugungsintensität, die einem Realabstand von 6,35 nm entspricht.

D: Dichteverteilung der 14,5 nm-Periode durch Filterung auf die meridionalen Ordnungen in C

Das in Abb. 3-27 A dargestellte Aggregat aus einem Lipid-Ansatz ist von fächerförmiger Grundgestalt, wobei die Enden und Kanten in graduell schwächer werdendem Kontrast auf dem Hintergrund des Lipidlayers auslaufen. Der Parakristall hat keine einheitlich definierte Längsachse. Dies führt dazu, dass die auch bei schwacher Kontrastierung prägnante 14,5 nm-Periode einen bogenförmigen Verlauf aufweist. Dieser Musterverlauf, wie auch das gesamte Erscheinungsbild erinnern an den Aufbau einer papiernen Flüstertüte. Eine der einfachsten möglichen Auswirkungen einer konischen Aufrollung von Mikrostrukturen auf deren Beugungsbild ist die kurvenartige Verbreiterung von Beugungsreflexionen zu konzentrischen Streifungen (Amelinckx *et al.*, 1996). Derartige Effekte sind in Abbildung 3-27 B besonders bei den dem Ursprung weiter entfernten *spots* zu erkennen.

Im zentralen Bereich sind neben der dominierenden, hellen Linie der 14,5 nm-Periode weitere Färbungsschwankungen zu erkennen, die in Abb. 3-27 A durch Pfeilspitzen hervorgehoben sind; sie sind recht schwach ausgeprägt, jedoch kann in bevorzugten Bereichen der aus den FFTs hervorgehende Abstand erahnt werden. FFTs aus unterschiedlichen Bereichen dieses Aggregats weichen naturgemäß deutlich voneinander ab, da sich die Dichteverteilung, bedingt durch den asymmetrischen Aufbau aber auch durch Schwankungen der Dicke des Präparats, stetig ändert. In den kontrastarmen Randzonen, in denen die diffusen Schwärzungsschwankungen nicht zu beobachten sind (Ausschnitt II), herrschen 14,5 nm-Ordnungen vor (Abb. 3-27 C). Dabei erscheint die dritte Ordnung, wie schon für andere Schichtanordnungen (Abb. 3-26) beschrieben, deutlich betont. Dass auch hier das in D dargestellte, bereits anhand von Abb. 3-24 beschriebene 14,5 nm-Grundmuster modifiziert ist, zeigt die Anwesenheit einer *off-meridionalen* Intensität bei einem Abstand von 6,35 nm (Pfeil), die durch die gewählte Filterung nicht erfasst wird. Dieser Abstand findet sich zusammen mit anderen nicht auf dem Meridian zentrierten oder linienartigen Intensitätskonzentrationen in FFTs des zentralen Bereichs (Ausschnitt I) des Aggregats wieder (Abb. 3-27 B). Die Realabstände dieser Linien können, wie in Tab. 3-6 zusammengefasst, auf Ordnungen von 58 nm indiziert werden.

Tab.: 3-6: Realabstände der nicht-14,5 nm-Gitterlinien aus Abb. 3-27 B und Indizierung auf Ordnungen von 58 nm (Bestimmung über Pixelabstand in der FFT (256*256 Pixel) durch Kalibrierung auf die dritte Ordnung von 14,5nm)

Abstand aus FFT	52 nm	19,84 nm	8,4 nm	6,32 nm	4,42 nm	3,36 nm
58 nm-Ordnungen	1: 58 nm	3: 19,33 nm	7: 8,29 nm	9: 6,44 nm	13: 4,46 nm	17: 3,41 nm

Die deutlichsten Abweichungen von den berechneten Werten ergeben sich dabei bei zunehmend großen Realabständen, da in diesem Bereich nahe dem Beugungsursprung die

FFT schlechter auflöst. Dieser Unschärfe-Effekt ist häufig bei Diffraktionsmustern zu beobachten; er wird hier zusätzlich durch die Pixelung verstärkt.

Ein weiteres, jedoch weitaus höher geordnetes Beispiel, in dem sich eine 58 nm-periodische Färbungsverteilung ergibt, ist in Abb. 3-28 dargestellt. Derartig langgestreckte, zylinderförmige Objekte, die durch die Kontrastmittelverteilung über die Breite deutlich gewölbt erscheinen und über weite Bereiche einen relativ konstanten Durchmesser (Abb. 3-28 A) aufweisen, wurden ausschließlich in Präparaten von 2-19 nach SDP gefunden. Verschiedene Exemplare können dabei recht unterschiedliche Breite aufweisen. Eine auf 58 nm zu indizierende (Tab. 3-7), periodische Dichteschwankung konnte zwar nur in ausgewählten Objekten beobachtet werden, unterschiedliche Parakristalle waren jedoch durch ihr charakteristisches Erscheinungsbild und die Grundperiode von 14,5 nm eindeutig diesem Typ zuzuordnen.

Tab.: 3-7: Realabstände der nicht-14,5 nm-Gitterlinien aus Abb. 3-28 C und Indizierung auf Ordnungen von 58 nm (Bestimmung über Pixelabstand in der FFT (256*256 Pixel) durch Kalibrierung auf die 5. Ordnung von 14,5 nm)

Abstand aus FFT	52 nm	8,43 nm	6,36 nm	5,28 nm	4,45 nm	3,39 nm	3,06 nm
58 nm-Ordnungen	1: 58 nm	7: 8,29 nm	9: 6,44 nm	11: 5,27 nm	13: 4,46 nm	17: 3,41 nm	19: 3,05 nm

Im Gegensatz zu den in Abb. 3-28 E herausgefilterten fleckenartigen Färbungen, die über die Länge des Aggregats variieren, jedoch immer einen axialen Abstand von 58 nm einhalten, bleibt die in Abb. 3-28 B deutlich hervortretende Grundperiode von 14,5 nm über den gesamten Parakristall in konstanter Weise erhalten und erstreckt sich durchgängig über die vollständige Breite des Zylinders.

Die Filterung auf die meridionalen 14,5 nm-Intensitäten der FFT (Abb. 3-28 C), die hier bis zur 5. Ordnung vorhanden sind, ergibt ein Muster, das geprägt ist durch die prominente helle Bande von ca. 2,5 nm Breite. Bei näherer Betrachtung des Ausschnittes in Abb. 3-28 B wird deutlich, dass die Feinstruktur innerhalb dieser außergewöhnlich scharf definierten Streifung sowohl in lateraler als auch in axialer Richtung nicht homogen, sondern variabel erscheint. Diese Strukturelemente erscheinen als vertikale Modulation in der Filterung in Abb. 3-28 E, welche die Ordnungen von 14,5 nm ausschließt. Positive Färbung von ca. 4,1 nm entfernten Ladungsklustern entlang der *coiled coils* könnten zu diesen Variationen beitragen. Die Rekonstruktion der Dichteverteilung (Abb. 3-28 D) leitet sich aus einem Rahmen ab, der die gesamte Breite des Ausschnittes in B erfasst. Der optische Eindruck einer nicht konstanten Substruktur wird bestätigt, wenn kleinere Rahmengrößen oder höhere Digitalisierungsauflösungen zur Transformation verwendet werden: zwar ist ein dem in D dargestellten Muster ähnliches vorherrschend, es finden sich jedoch unterschiedlichste Abwandlungen, deren gemeinsamer Nenner lediglich die 2,5 nm breite helle Bande ist.

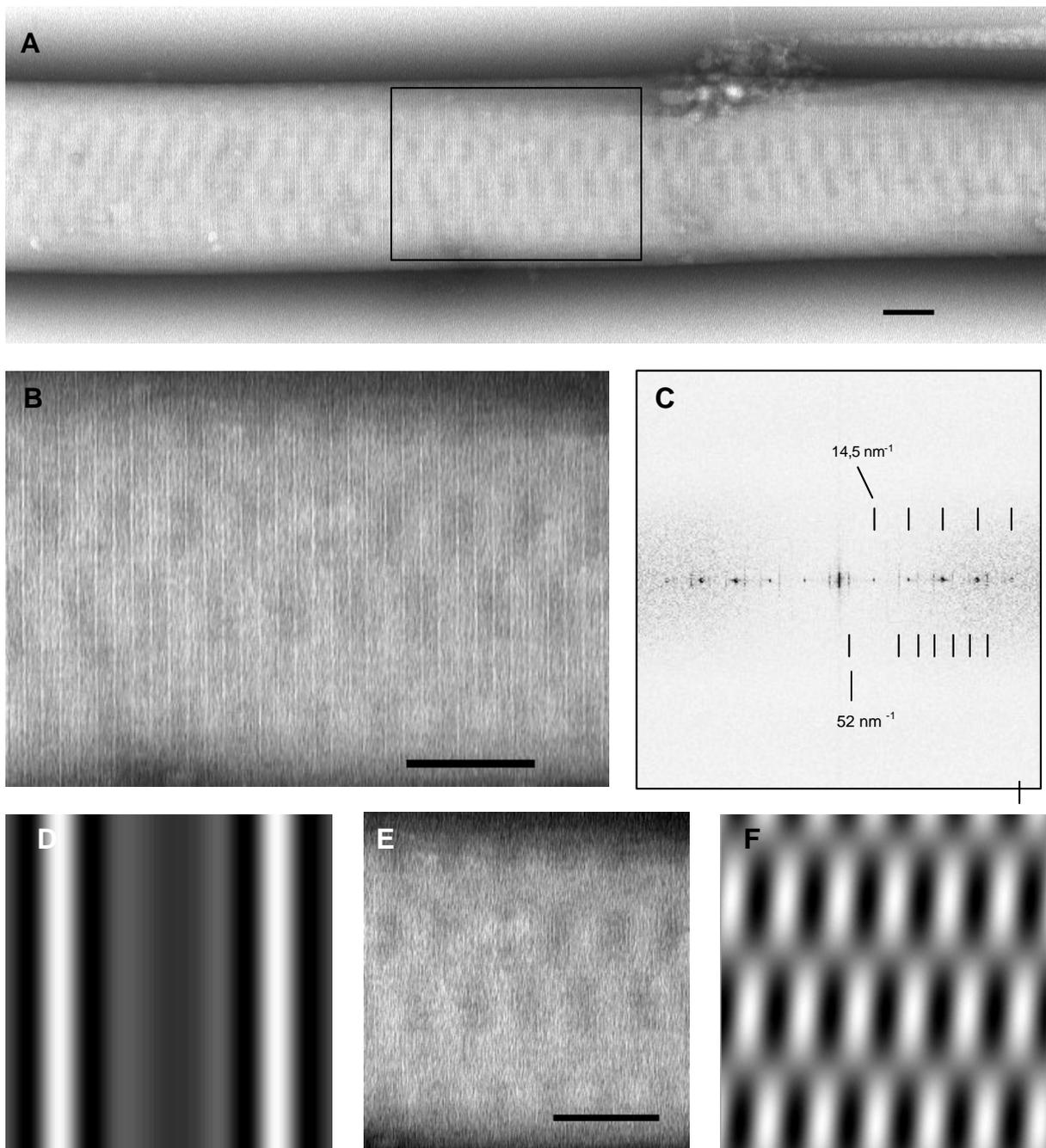


Abb.: 3-28: Zylinderförmiger Parakristall von 2-19 nach SDP

(50 mM KCl; 10 mM Imidazol, pH 7,2; 2 mM MgCl₂; 0,02 % NaN₃)

- A: Übersicht**, die diffuse Färbungsvariationen entlang des Aggregats zeigt; Balken = 100 nm, Box markiert den Abschnitt in:
- B: Ausschnittsvergrößerung** des in A markierten Bereichs mit prominenter 14,5 nm-Periode; Balken = 100 nm
- C: FFT** (256*256 Pixel) aus dem Ausschnitt in B; die Marken zeigen horizontale (axiale) Gitterabstände der Ordnungen von 14,5 nm (oben) und der Ordnungen von 58 nm (unten), deren Realabstände in Tab. 3-7 den 58 nm-Ordnungen gegenübergestellt sind.
- D: Dichteverteilung** über die 14,5 nm-Periode durch Filterung auf die entsprechenden meridionalen Ordnungen der FFT in C
- E: Inverse FFT** aus C unter Ausschluss (Maskengröße: 3 Pixel) der meridionalen Ordnungen von 14,5 nm; Balken = 100 nm. Neben den fleckenartigen Färbungen sind feine Längsstreifungen zu erkennen, deren Periode keiner ganzzahligen Ordnung von 14,5 nm entsprechen.
- F: Filterung** auf die *off*-meridionalen Beugungsintensitäten nahe 58 nm (Maskengröße: 1 Pixel, Pixel-Positionen relativ zum Meridian: -1 & 2); dimensioniert wie E

In Abb. 3-28 F schließlich wurde aus dem zentralen Bereich des Aggregats eine Filterung auf die hier schachbrettartig verteilten Schwärzungen vorgenommen. Der Rückblick auf Abb. 3-28 A verdeutlicht, dass diese Verteilung nur in der Mitte des Parakristalls vorliegt; zu beiden Seiten verschiebt sich die relative Lage der einzelnen Kontrastmittel-Akkumulationen relativ zueinander, bis sich das Schachbrettmuster zugunsten einer Diagonalbänderung auflöst. Damit scheint eine echte Kristallinität nicht gegeben.

An dieser Stelle soll ein eher zufälliger Fund Erwähnung finden, der aus demselben Ansatz stammt, in dem die in Abb. 3-28 beschriebenen Strukturen beobachtet worden waren. Nach längerer Lagerung des Ansatzes bei 4°C bildete sich ein makroskopisch wahrzunehmendes Präzipitat, das sich durch ungewöhnliches spezifisches Gewicht (Schütteltest) von üblicherweise vorhandenen Niederschlägen unterschied. Bei lichtmikroskopischer Analyse wurden die in Abb. 3-29 dargestellten Gebilde gefunden. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier um Makro-Kristalle des Fragments 2-19 handelt (Pufferkontrolle negativ), die allerdings, wie aus den Darstellungen zu entnehmen, Torsionen aufweisen. Diese äußern sich darin, dass die Kristallflächen konvex gebogen sind. Zudem sind in Abb. 3-29 A Lufteinschlüsse zu erkennen. Ein einfacher Test auf echte Kristallinität durch im Polarisationsfilter zu analysierende Doppelbrechung fiel entsprechend negativ aus. Die Kristalle schienen einen sehr geringen Wassergehalt aufzuweisen und waren von hoher Festigkeit. Es muss allerdings darauf verwiesen werden, dass es sich nicht um einen Kristallisationsversuch gehandelt hat, Temperatur- und Volumen-Konstanz waren nicht gegeben. Weitergehende Versuche und Analysen wurden nicht durchgeführt.

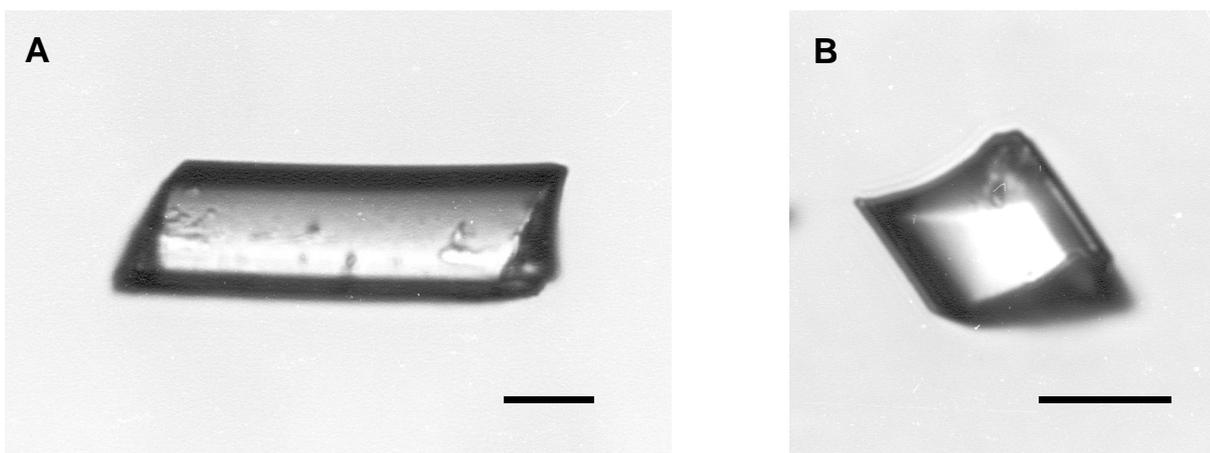


Abb. 3-29: Phasenkontrast-Aufnahmen von Kristallen; Fragment 2-19, 14 Tage nach SDP (Endkonzentration nach Verdünnungsprozedur: 0,1 mg/ml in 50 mM KCl; 10 mM Imidazol, pH 7,2; 2 mM MgCl₂; 0,02 % NaN₃); Balken = 10 µm

3.7.4 Aggregate mit einer übergeordneten Periode von 116 nm

Wie zu Beginn des Kapitels 3.7 bereits erwähnt, zeigt das Fragment 2-19 in ganz besonderer Weise die Tendenz, sehr unterschiedliche Aggregattypen zu formen. So sind die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Effekte ausschließlich an Zusammenlagerungsformen dieses Expressionsproduktes zu beobachten. Mit diesem Fragment und dessen Glutamat-Mutante konnte ein weiterer, sehr spezialisierter Parakristalltyp erhalten werden, der insbesondere im Hinblick auf die Herkunft der LMM-Fragmente aus Insektenmuskeln bemerkenswerte periodische Eigenschaften aufweist. Parakristalle mit den nachfolgend beschriebenen Charakteristika wurden in beiden Puffersystemen (Imidazol und Histidin) und bei unterschiedlicher Vorgehensweise zur Absenkung der Ionenstärke (Mehrschrittdialyse und Gradientendialyse) gefunden. Die einzelnen Objekte zeigen dabei ein sehr kompliziertes Bänderungsmuster, das mit bloßem Auge kaum zu analysieren ist. Daher kann der Nachweis, dass es sich um gleichartige, mindestens aber um verwandte Assoziationsformen handelte, nur über Fourier-Transformationen verschiedener Exemplare geführt werden. Auch die übergeordnete Periode konnte letztlich nur über das Hilfsmittel der Diffraktion sicher bestimmt werden. Abb. 3-30 stellt zwei Exemplare (A bzw. B) dieses Typs vor, der meist von spindelförmiger Grundgestalt ist.

Der Vergleich der Abb. 3-30 A und C verdeutlicht, wie schwierig eine optische Einstufung in eine gemeinsame Klasse erscheint. In Abb. 3-30 A handelt es sich um ein sehr kleines Aggregat, in dem weder ein konstant wiederkehrendes Streifungsmuster noch ein Bereich konstanter Dicke vorliegt. Auch hier könnten Positivfärbungen von Ladungsmustern das Gesamtbild der Querstreifung mit beeinflussen. Ein auffälliges zentrales Streifenpaar weist einen Abstand von 116 nm auf (Markierungen in Abb. 3-30 A). Es scheint möglich, dass die linke Begrenzung gleichzeitig eine Spiegelebene darstellt. Beiderseits dieser Ebene wird durch die markanteren hellen Streifen ein Muster generiert, das der polaren Abfolge 43,5 nm-29 nm-14,5 nm-29 nm entsprechen könnte. Damit läge in diesem Fall ein bilateral-symmetrisches Exemplar vor, das sich essentiell wie ein Insekten-Filament mit einem zentralen bipolaren Bereich und Flanken mit polarer, 116 nm-periodischer Molekülabfolge verhält. Trotz dieser axialen Variabilität konnten in den auch durch die geringen Dimensionen bedingt schwach definierten Beugungsmustern Abstände identifiziert werden, die denen des in Abb. 3-30 B vorgestellten Parakristalls entsprechen. Ein deutlicher Unterschied, der auch an anderen, schlechter geordneten Beispielen beobachtet wurde, lag in der Anwesenheit einer Beugungsintensität bei 14,5 nm im Beugungsdiagramm des Parakristalls aus Abb. 3-30 A (nicht dargestellt). Diese axiale Grundperiode ist in der Tat auch integraler Bestandteil des kompakten Parakristalls in Abb. 3-30 B, dessen zentraler, unipolar gebänderter Abschnitt in Abb. 3-30 C vergrößert dargestellt ist. In diesem Bereich wurde die in D dargestellte Fourier-Transformation erstellt, in der axiale Abstände der Obertöne von 14,5 nm markiert sind:

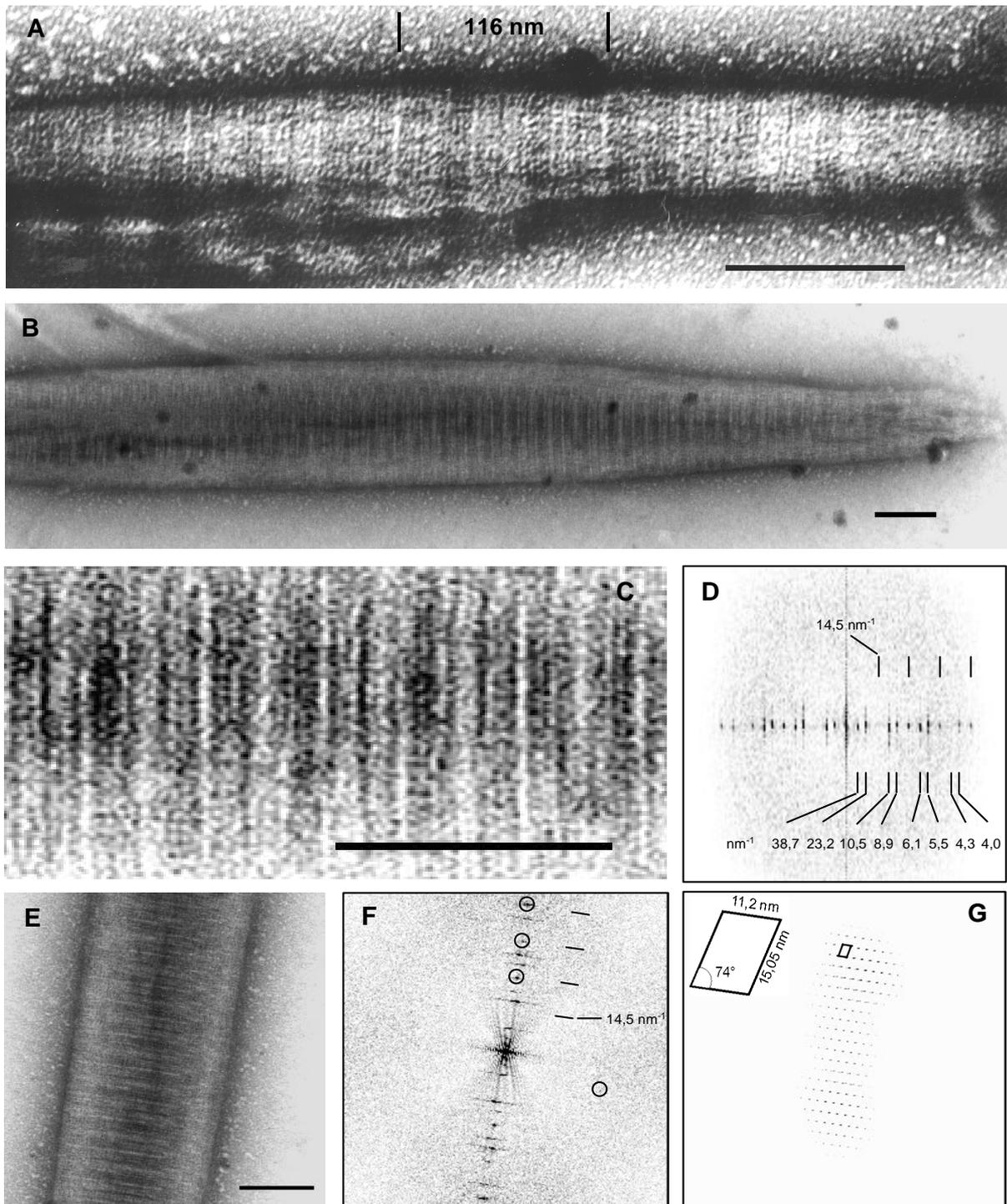


Abb. 3-30: 116nm-periodische Aggregate des Fragments 2-19

A: kleiner Parakristall nach Mehrschritt-Dialyse in 50 mM KCl; 10 mM Imidazol, pH 7,2; 2 mM MgCl₂; 0,02 % NaN₃. Balken = 100 nm

B: kompakte Spindel aus der gleichen Präparation wie A; Balken = 100 nm

C: Vergrößerung aus dem zentralen Bereich des Parakristalls in B; Balken = 100 nm

D: Fourier-Transformation aus dem in C dargestellten Bereich; Ebenenabstände von 14,5 nm (keine Beugungsintensität) und Obertöne hiervon sind oben markiert, unten: Ordnungen von 116 nm

E: Ausschnitt (Balken = 100 nm) desselben Objektes zur Darstellung von:

F: FFT von E; Ebenenabstände von 14,5 nm und Obertöne sind markiert; eingekreist: Beugungspunkte zur Filterung in:

G: inverse FFT aus F (aus gekreisten Beugungspunkten in F); die Einheitszelle mit der 14,5 nm meridionalen Periode ist dargestellt

Meridional zentrierte Beugungsintensitäten entstehen auf der 2. bis 4. Ordnung dieses Fundamentalwertes.

Bestimmt wird das Diffraktionsmuster jedoch von Intensitäten, die ihren Schwerpunkt nicht auf dem Meridian aufweisen, sondern sich linienartig seitlich davon ausbreiten. Diese Linien scheinen sich aus einer Reihe von aufeinander folgenden Maxima zu bilden. Die Realabstände dieser Linien, die anhand der Pixelabstände unter Zuhilfenahme der 4. Ordnung von 14,5 nm ermittelt wurden, sind in Abb. 3-30 D notiert. Sie entsprechen exakt folgenden Ordnungen von 116 nm: 3, 5, 9, 11, 19, 21, 27 und 29. Diese hohe Übereinstimmung resultiert aus der optimalen Abstimmung von Primärvergrößerung und Digitalisierungs-Schrittweite. Da die Intensitäten entlang der Linien nicht klar definiert sind, lässt sich eine Filterung auf diese 116 nm-Ordnungen nicht durchführen, jedoch wird aus Abb. 3-30 C deutlich, dass das Muster polar ist. FFTs aus den Endabschnitten der Spindel weisen im Hinblick auf die Beugungsintensitäten nahe des Meridians dieselben Charakteristika wie die in Abb. 3-30 D gezeigte auf. Die Teilabbildungen 3-30 E bis G demonstrieren darüber hinaus, dass im zentralen Bereich dieses Parakristalls auch Anzeichen für eine laterale Ordnung der Moleküle vorhanden sind. Ein in der Fläche der FFT zu beobachtender Beugungsreflex (Abb. 3-30 F: Kreis) tritt bei entsprechender Orientierung des Aggregats in mehreren Transformationen auf. Er bildet mit der 14,5 nm-Periode die in Abb. 3-30 G graphisch hervorgehobene Einheitszelle, in der eine Kante von 11,2 nm im rechten Winkel zur Längsachse des Parakristalls orientiert ist. Es handelt sich in G um eine inverse FFT unter Verwendung der in F markierten Reflexe, bei der lediglich ein Punktmuster rekonstruiert wird. Dieses Muster beschreibt Linien im Abstand von 14,5 nm und demonstriert damit die Zuordnung der meridionalen Obertöne zu dieser Periode. Senkrecht zu diesem axialen Abstand ergeben sich 11,2 nm voneinander entfernte Punkte. Damit erweist sich auch der in der Fläche gefundene Beugungspunkt als die zweite Ordnung des tatsächlichen Realabstandes. Die Abwesenheit von beobachtbaren Beugungsintensitäten auf den Primärordnungen der Einheitszellenkanten muss somit auf die Symmetrieverhältnisse innerhalb der übergeordneten 116 nm-Periode zurückzuführen sein. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen bestimmter Ordnungen ist die Anwesenheit einer Gleitsymmetrie innerhalb einer Einheitszelle, die ungerade Ordnungen unterdrückt („forbidden reflections“).

Die Dimensionen der Einheitszelle wurden aus einer erneuten Transformation des Punktmusters in G gewonnen. Zwar repräsentiert das rekonstruierte Punktmuster lediglich einen Teilaspekt der gesamten Dichteverteilung, jedoch weist diese Retransformation (nicht dargestellt) ebenfalls alle *off*-meridionalen Intensitäten auf den o.g. Perioden von 116 nm auf. Die gefilterten Punkte sind also ebenfalls Bestandteil des 116 nm-Gitters. Die in Abb. 3-30 G konstruierte Einheitszelle ergibt - in der Fläche wiederholt - ein 116-nm-periodisches Gitter mit den Eckdaten $a=116$ nm, $b=33,6$ nm und $\gamma=90^\circ$, dessen Gitterpunkte eine zentrale Gleit-

symmetrie aufweisen. So wird die Abwesenheit von Beugungsintensitäten auf den Primärordnungen erklärlich. Die schwächere Intensität auf der ebenfalls ungeraden 3. Ordnung von 14,5 nm sollte dann auf die inhärente Unordnung des Parakristalls zurückzuführen sein.

4 Diskussion

LMM, das Leichte Mero Myosin, stellt den aggregationsfähigen Teil des Myosinmoleküls dar, der für die Integration einzelner Monomere in das Verbundsystem der dicken Filamente von Muskeln zuständig ist. Die Definition eines gesonderten Molekülabschnitts geht auf die Gewinnung proteolytischer Spaltprodukte dieses mit ca. 500 kDa vergleichsweise großen, hexameren Proteins zurück. Es lässt sich durch bestimmte Proteasen an strukturell dafür prädestinierten Stellen in einzelne, auch funktionell verschiedene Teilstücke zerlegen. Eines der tryptischen Produkte ist jener annähernd der C-terminalen Hälfte des Myosinstabes entsprechende *coiled coil*-Abschnitt LMM, einem Dimer also aus gewundenen α -Helices. Er wird in isolierter Form seit langem (Huxley, 1963) dazu herangezogen, Informationen über die Art und Weise zu erhalten, wie die Myosinmoleküle im Filament strukturell organisiert sind und welche Molekülabschnitte bestimmte Eigenschaften des Gesamtproteins determinieren oder beeinflussen.

Der klassische Ansatz der proteolytischen Darstellung, wenngleich auch im Sub-Domänen-Bereich erfolgreich (Ikebe *et al.*, 1991; Nyitrai *et al.*, 1983), stößt jedoch unweigerlich an Grenzen: Die Herstellung kleinerer Unterabschnitte ist an die Anwesenheit sequenzspezifischer Spaltstellen gebunden, vergleichende Untersuchungen sind somit nur schwer möglich. Zudem stellt die Aufarbeitung homogener Präparationen definierter Bereiche auch und besonders im Falle des Insekten-LMM ein großes Problem dar (Pohlmann, 1988; Schmitz, 1990). Seit geraumer Zeit geht man nun dazu über, molekularbiologische Methoden zur gezielten Herstellung von Teilabschnitten des LMM über Expression in Bakterien einzusetzen. Insbesondere die Deletion bestimmter Bereiche kann dabei Aufschluss über die Lokalisation essentieller Domänen für z.B. Löslichkeit und Aggregationseigenschaften geben.

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit sollte ein Expressionssystem etabliert werden, das zur Herstellung unterschiedlicher LMM-Peptide geeignet ist. Eine Reihe so produzierter Fragmente des *Drosophila*-Stabes wurde im Hinblick auf deren spezifische Eigenschaften wie Löslichkeit, Aggregationsformen, Wechselwirkung mit Myosin-assoziierten Proteinen und mögliche sekundäre Modifizierbarkeit charakterisiert. Die Auswahl der Fragmente ist geeignet, speziell die Rolle des N-terminalen LMM-Drittels und den Einfluss C-terminaler Sequenzen auf deren Eigenschaften näher zu untersuchen. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob und gegebenenfalls wie einzelne Abschnitte des LMM die Struktur dicker Filamente aus Insektenflugmuskeln determinieren.

4.1 Klonierung und Expression

Die molekularbiologischen Techniken der Manipulation und Modifikation von DNA sind mittlerweile Routine, die meisten Operationen werden durch kommerziell erhältliche Baukasten-("Kit"-)Systeme nicht nur vereinfacht, sondern gleichzeitig standardisiert. Bis auf wenige Ausnahmen, bei denen besondere Anpassungen an die speziellen Anforderungen des zu etablierenden Expressionssystems bzw. zur Optimierung von Teilschritten vorgenommen werden mussten, trifft dies auch für die hier durchgeführten Klonierungsarbeiten zu.

An erster Stelle sind hier die Bedingungen zur Amplifizierung von Teilsequenzen aus der *Drosophila*-LMM-Sequenz zu nennen. Die Klonierungsstrategie bedingt eine weitestgehende Unflexibilität im Hinblick auf die Gestaltung der für die PCR-Reaktionen zu verwendenden Primer. Die spezifischen Hybridisierungssequenzen sind durch die Vorauswahl der zu exprimierenden Fragmente, die auf Ergebnisse des Arbeitskreises Pepe zurückgehen (Chowrashi *et al.*, 1996), festgelegt. In Abhängigkeit vom jeweiligen Expressionsvektor und von der Aufarbeitungs- und Reinigungsmethode sind Überhangsequenzen von teilweise beträchtlicher Länge in die Oligonukleotide einzubauen, was eine spezifische Hybridisierung an die Matrizen-DNA, die schon prinzipiell durch das Vorhandensein stark homologer Sequenzen erschwert ist, nicht erleichtert. So mussten gegebenenfalls für bestimmte Primer oder Primer-Kombinationen die PCR-Bedingungen im Hinblick auf Qualität und Quantität des Produktes gesondert optimiert werden. Kombiniert mit einer gelelektrophoretischen Isolierung des PCR-Produktes der gewünschten Größe, wurde in keinem der letztendlich sequenzierten *inserts* ein Fehlprodukt detektiert. Die Effizienz des eigentlichen Klonierungsschrittes, d.h. das Einbringen eines gereinigten PCR-Produktes in - zumeist - ein Expressionsplasmid wurde in Kapitel 3.1 am Beispiel der Ligation von *inserts* in den pET-Vektor vorgestellt. Hier handelt es sich um eine vergleichsweise erschwerte Insertierung, da – bedingt durch die speziellen Eigenschaften des in Frage kommenden Restriktionsenzym - einseitig eine *blunt-end*-Fusion vorgenommen werden musste. Durch die hier gewählten Bedingungen konnte eine Rate an positiv getesteten Klonen von mindestens 50 %, in Einzelfällen noch weit darüber, erreicht werden.

Für die Überexpression von Proteinen und Polypeptiden in Bakterien steht eine Vielzahl von auch kommerziell erhältlichen Vektorsystemen zur Verfügung, die zum überwiegenden Teil nach einem gemeinsamen Prinzip aufgebaut sind: Es werden Fusionsproteine aus a) dem zu exprimierenden Zielpeptid, b) einer Linkersequenz und c) einer zur Affinitätsreinigung nutzbaren Sequenz oder Proteindomäne translatiert. Dabei enthält der Linker zumeist einen Abschnitt, der für eine Protease-spaltbare Peptidsequenz kodiert, so dass das gewünschte Produkt in möglichst unveränderter Form aus dem Fusionskonstrukt freigesetzt werden kann. Voraussetzung für die Verwendung solcher Systeme ist ein gezielter Verdau der jeweiligen Schnittstelle, weshalb zu diesem Zweck nur hochspezifische Endoproteasen zum Ein-

satz kommen. Dieser prinzipielle Ansatz wurde zunächst auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit favorisiert, wobei unterschiedliche Systeme getestet wurden, darunter p340 (Snouwaert *et al.*, 1989), pMal (Fa. NEB) sowie pTrcHis (Fa. Invitrogen). Diese unterscheiden sich zunächst im Fremdproteinanteil (Affinitäts-*tag*) und somit in der Art der Aufreinigung des Zielproteins. Entscheidend ist jedoch die Art der Abspaltung des *tags*, zu der verschiedene Enzyme benutzt wurden. Die Vektoren stellen Linker mit Zielsequenzen für Kollagenase (p340), Faktor Xa (pMal) und Enterokinase (pTrcHis) zur Verfügung. Darüber hinaus wurde in den beiden letzteren Systemen ein Einbau der jeweils anderen Erkennungsstelle in die Primersequenz vorgenommen, um das Auftreten von Überhang-Aminosäuren zu unterbinden.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass es in keinem der Fälle möglich war, homogene Präparationen der Zielproteine zu erhalten. Trotz der Verwendung sehr spezifischer Proteasen konnte eine Degradation der Produkte nicht verhindert werden: es entstanden durchgängig mehrere Produkte, deren Molekulargewichte sich bis zu 10 kDa unterschieden. Dieser Befund war unerwartet, da auch das längste der zu exprimieren LMM-Fragmente, das jeweils als Modell-Protein zur Eignung der Methode untersucht wurde, keine internen Sequenzen aufweist, wie sie als spezifische Schnittstelle für diese Enzyme angegeben werden. Für alle drei Proteasen wurde intensiv versucht, die jeweiligen Verdauungsbedingungen so zu optimieren, dass eine spezifische Spaltung der einmaligen "Restriktions"-Sequenz erfolgte.

Weder für die Kollagenase noch für den Blutgerinnungsfaktor konnte eine entscheidende Verbesserung der Spezifität durch Variation von Enzym:Substrat-Verhältnissen oder Pufferbedingungen erreicht werden.

Im speziellen Fall der Enterokinase konnten Fortschritte erzielt werden, jedoch war die Ausbeute an korrekt gespaltenem Fusionsprotein (in diesem Fall über das pTrcHis-System hergestellt) präparationsbedingt so gering, dass dieses Verfahren als nicht geeignet eingestuft wurde. Ein möglichst quantitativer Verdau kann nur dann erzielt werden, wenn sich das Zielprotein in Lösung befindet, was bei den aggregationsfähigen LMM-Fragmenten nur in hoher Ionenstärke möglich ist. Diese Bedingungen weichen jedoch stark von den für die angesprochenen Enzyme optimalen ab, so dass dies als ein möglicher Grund für eine hohe Rate an unspezifischer Proteolyse-Aktivität angesehen werden kann. Darüber hinaus ist eine ausschließliche Beschränkung auf eine bestimmte Aminosäure-Abfolge, die mit der Spezifität von Restriktionsendonukleasen vergleichbar wäre, bei Proteasen ganz allgemein und auch im Besonderen für die hier eingesetzten nicht gegeben, wenngleich letztere eine vergleichsweise sehr hohe Affinität zu ihren spezifischen Sequenzen aufweisen (Mattler & Bang, 1977). Dass die Enterokinase-Behandlung optimiert werden konnte, ist auf die Wahl spezieller Pufferbedingungen zurückzuführen, die sowohl eine wahrscheinlich sehr eingeschränkte

Enzymaktivität als auch offensichtlich eine teilweise Solubilisierung des Fragmentes (hier: 3-19) erlauben. Insgesamt musste aber auch dieser Ansatz als sehr ineffizient, speziell im Hinblick auf den zeitlichen und präparativen Aufwand, eingestellt werden.

Den oben beschriebenen Klonierungs-Bemühungen lag das Bestreben zugrunde, die einzelnen Zielproteine in möglichst unveränderter Primärstruktur herzustellen. Dies ist praktisch nur unter Verwendung von Proteasen möglich, die am Ende einer Erkennungssequenz spalten, da auch unter Ausschluss eines abzuspaltenden Affinitäts-*tags* von Bakterien ein initiales Formyl-Methionin synthetisiert wird. Nachdem sich der Weg über den Einsatz von Proteasen an Fusionsproteinen als nicht gangbar herausgestellt hatte, wäre als eine mögliche Alternative die Expression von Proteinen ohne Fremdsequenzen in Frage gekommen. Hier stellt sich aber das Problem der Aufreinigung der Zielproteine aus dem Bakterienlysat. In der Literatur haben sich im wesentlichen zwei Lösungsansätze durchgesetzt: Unlösliche Fragmente von LMM können durch mehrere Zyklen von alternierender Dialyse gegen Hoch- und Niedrigsalz-Puffer angereichert werden (De Lozanne *et al.*, 1987; Maeda *et al.*, 1989), eine abschließende chromatographische Reinigung ist jedoch zur Erlangung eines ausreichenden Reinheitsgrades nötig (Kakinuma *et al.*, 1997). Für ein universelles System, das eine Reinigung der Fragmente unabhängig von ihren spezifischen Eigenschaften erlaubt, ist dieser Ansatz jedoch nicht praktikabel. Andere Autoren nutzen eine weitere Eigenschaft von *coiled coil*-Proteinen, die hohe Resistenz gegen Hitze (Atkinson & Stewart, 1991a; O'Halloran *et al.*, 1990), um Fragmente unabhängig von ihrer Löslichkeit anzureichern. Thermodynamische Untersuchungen zeigen jedoch am Beispiel von Karpfen-LMM, dass eine wirklich vollständige Renaturierung nach Hitze-Behandlung nicht erfolgt (Nakaya *et al.*, 1997). Darüber hinaus sind auch hier für unterschiedliche Fragmente spezifische Säulenreinigungsprozeduren zu entwickeln (O'Halloran *et al.*, 1990), was auch dieses Vorgehen als sehr unattraktiv erscheinen lässt, wenngleich Atkinson *et al.* (1991) eine einheitliche Methode für 5 verschiedene LMM-Proteine beschreiben.

Für ausgedehnte, systematische Untersuchungen verschiedenster Fragmente ist ein Expressionssystem wünschenswert, das eine einheitliche, unkomplizierte Reinigungsprozedur erlaubt. Dies lässt sich in erster Linie über eine Affinitätschromatographie erreichen. Das kleinste Affinitäts-*tag* stellt die Hexa-Histidin-Sequenz dar, die eine Reinigung über Ni²⁺-Chelatierung ermöglicht. Eine solche Überhang-Sequenz scheint hinsichtlich der Länge tolerierbar, ähnlich große Fremdanteile werden üblicherweise bei der Klonierung in *multiple cloning sites* hingenommen (je eine der in Reihe angeordneten palindromischen Erkennungssequenzen kodiert meist zwei zusätzliche Aminosäuren). Die Histidin-Seitenketten sind mit einem pK von 6,0 nur schwach basisch und sollten – abhängig von der lokalen Konformation und Lösungsmittlexposition - im neutralen bis leicht basischen Milieu deprotoniert vorliegen, so dass keine zusätzlichen Ladungen eingeführt werden, die mit ionischen Wechselwirkun-

gen interferieren könnten. Weitere nicht spezifische Aminosäuren sollten jedoch vermieden werden und sicher gestellt werden, dass sich das *tag* nicht an demjenigen Moleküle befindet, an dem der Einfluss kleinerer Domänen untersucht werden soll. Diese Bedingungen wurden mit der Klonierung in den pET 23 a-Vektor unter den in Kap. 2.3.4.1 beschriebenen Anpassungen umgesetzt. Die Anwesenheit des Histidin₆-Epitops am N-Terminus der Proteine kann dabei als ein systematischer Fehler angesehen werden, der die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander nicht tangieren sollte.

Erste Versuche, über dieses System Fragmente überzuexprimieren, zeigten zwar die außerordentliche Kapazität der Transkription über den T7-Promotor, jedoch wurden unterschiedliche Translationsprodukte erhalten. Die Ursache dieses Phänomens konnte anhand von *frameshift*-Simulationen auf die Anwesenheit einer Doublette in *E.coli* sehr selten verwendeter Arginin-Codons zurückgeführt werden – AGG und AGA tauchen in *E.coli* mit der niedrigsten Frequenz auf, die entsprechenden tRNAs sind die seltensten (Zahn & Landy, 1996). Zahlreiche Effekte bei der heterologen Überexpression werden insbesondere dem hier vorliegenden Fall des AGG-Doppel-Codons zugeschrieben (Chen & Inouye, 1990; Kane, 1995; Zahn, 1996). Angefangen von einem extremen Fall, bei dem das gesamte Protein-Synthesegschehen und Wachstum des Bakteriums beeinflusst wird (Zahn, 1996), über Fälle, in denen sogar *E.coli*-eigene Proteine betroffen sind (Misra & Reeves, 1985), können die Auswirkungen allgemein unter dem Oberbegriff aberranter Translation zusammengefasst werden. Diese wird beispielsweise auf die Homologie des AGG-Zwillings mit der Shine-Dalgarno-Sequenz (Ribosomen-Bindungsstelle der mRNA *upstream* vom Initiations-Codon) zurückgeführt, deren Anlagerung das Ribosom blockiert. Oft wird eine erheblich reduzierte Translationseffizienz für das entsprechende Protein beschrieben (Maleki & Hurlburt, 1997; Zahn & Landy, 1996), es ist aber nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität der Proteinprodukte betroffen. So entstehen Produkte unterschiedlicher Kettenlänge (Gursky *et al.*, 1992; Kane, 1995), wobei ein Überspringen kompletter Tripletts die Ausnahme bildet (Kane *et al.*, 1992). Die Simulation von Verschiebungen des Leserasters an der kritischen Stelle um ein bzw. zwei Nukleotide ergibt im Falle des Fragmentes 3-18 einen Molekulargewichtsverlust von 10,5 respektive 6,6 kDa durch vorzeitige Terminations-Codons im jeweiligen Leseraster. Die beobachteten Unterschiede im Vergleich zum vollständigen Protein betragen 11 bzw. 6 kDa und entsprechen damit fast exakt den Vorhersagen. Dabei liegt eine deutliche Bevorzugung des *frameshifts* um ein Nukleotid vor, was durchaus plausibel erscheint.

Aus diesem Grund wurde ein Austausch der entsprechenden Codons gemeinsam mit zwei im C-terminalen Exon 19-Abschnitt durch Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese vorgenommen. Die von Kunkel beschriebene Methode (Kunkel *et al.*, 1987), bei der die zu mutierende Sequenz in das Genom des Bakteriophagen M13 umkloniert wird, wurde hier in allen Mutationsansätzen durch den Einsatz von Phagemiden modifiziert, die leichter zu handhaben sind

und im Falle der Mutagenese an Expressionsvektoren die Umklonierung und Rückgewinnung des *inserts* ersparen. Allerdings ist die Effizienz bei der Verwendung von Phagemiden von zu erwartenden 50 % Positiven nach der Originalvorschrift (Ausubel, 1987) um den Faktor 5-10 herabgesetzt (Sambrook *et al.*, 1989). In einer Doppelmutation der Arginin-Codons mit zwei mutagenen Primern konnte eine Ausbeute von 10 % für beide Mutationen positiver Klone erzielt werden, ein unter diesen Vorhersagen zufriedenstellendes Ergebnis. Angesichts solcher Effizienzen stellte sich beim *screening* nach erfolgreicher Mutation das gezielte Einfügen einer neuen Restriktionsstelle bzw. das Verändern einer vorhandenen als unerlässliches Hilfsmittel heraus, um unnötigen Sequenzieraufwand zu vermeiden.

Für den abschließenden Mutationsschritt zur Einführung eines Glutamat-Restes für ein Serin im Exon 19-kodierten Abschnitt (Simulation einer Phosphorylierung) kann festgehalten werden, dass zwar die Ausbeuten an ssDNA bedingt durch die Eigenschaften des pET-Vektors als "low-copy"-Plasmid gering, die Effizienzen der Mutationsansätze aber mit 17-33 % positiver Klone mehr als ausreichend waren.

Auf dem skizzierten Wege konnte für insgesamt 12 Fragmente des Insektenmyosin-LMM mit dem pET-Vektor ein Expressionssystem etabliert werden, das eine einfache und auf alle Proteine anzuwendende Einschnitt-Reinigung erlaubt und sich insbesondere durch eine außergewöhnlich hohe Syntheseaktivität für die heterologen Produkte auszeichnet. Acht der Proteine, für die die DNA-Konstrukte erstellt worden waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Die hohe Translationsrate über das T7-Promotor-Polymerase-System, das der pET-Vektor für das *insert* zur Verfügung stellt, ist hinlänglich bekannt und der Hersteller Novagen gibt Anteile von 50 % und darüber am Gesamtprotein der *E.coli*-Zelle für bestimmte Expressionsprodukte an. Gemeinhin geht man von Werten bis 40 % aus für Proteine, die dann als unlösliche und denaturierte Einschluss-Körper abgelegt werden. Für lösliche Proteine werden weitaus geringere Anteile angegeben. Die mit den hier exprimierten LMM-Abschnitten erreichte Fremdprotein-Fraktion in Lysatproben präparativer Ansätze liegt teilweise weit über diesen Werten. In Einzelfällen kann der Anteil überexprimierten Proteins im Bakterienlysat bis zu 90 % ausmachen. Für derartige Expressionseffizienzen ist die strikte Einhaltung der Selektionsbedingungen und Animpfungsprotokolle essentiell. Dies ist ein Zeichen dafür, dass Plasmidverlust einen zu berücksichtigenden Faktor darstellt.

Für die hier exprimierten Proteine gewährleisten die ausgearbeiteten Kombinationen von Vektor und Wirtsbakterium eine stabile Überexpression. Sollte sich im Zuge weiterer Klonierungsversuche der Punkt der Plasmidstabilität (meist verursacht durch "leckende" Promotoren, d.h. Minimalexpression vor Induktion) für bestimmte Produkte als problematisch herausstellen, so stehen mit dem etablierten System weitere Optionen offen. T7-Polymerase kann beispielsweise in entsprechenden Wirtsstämmen durch Phagen-Infektion zugeführt werden.

Ein Wechsel auf pET 21-Vektoren, die dual durch Repressor abgesichert sind (*lac*-Promotor vor T7-Polymerase und vor dem *insert*), ist alternativ in Betracht zu ziehen. Darüber hinaus stehen mit den im Rahmen der Arbeit hergestellten Expressionsvektoren Plasmide zur Verfügung, die direkt durch ihre Eigenschaft als Phagemide zur Herstellung von Mutanten genutzt werden können.

Aufgearbeitete Proteine sind nach densitometrischer Auswertung zu ca. 95 % rein. Da hier auch Hintergrundschwankungen und in geringem Umfang proteolytische Effekte mit einfließen (Abb. 3-7), können die nach dem beschriebenen Protokoll isolierten Proteine als rein bezeichnet werden. Die außergewöhnlich hohe Expressionsaktivität ist mit ein Garant für die Erlangung eines hohen Reinheitsgrades. Ein Anteil von 50- 90 % Zielprotein, wie hier schon in der Primärprobe vorliegend, ist bei konventionellen Isolierungen oft erst nach diversen Reinigungsschritten erreicht. Im Vergleich verschiedener Affinitätsmatrices rangiert die Nickel-Chelatierung hinsichtlich der Diskriminierungsfähigkeit eher im mittelmäßigen Bereich der Spezifitätsskala, da durchaus Proteine adsorbieren können, die lokal eine relativ unspezifische Häufung von aromatischen Seitenketten aufweisen. Aus diesem Grund beinhalten einschlägige Standardprotokolle (s. z.B. pET System-Manual der Fa. Novagen) zusätzliche Waschschrte, die meist durch Zugabe von Imidazol Kontaminationen entfernen. Wenngleich derartige Waschschrte bei den hier erlangten Zielproteinkonzentrationen in der Auftragsprobe von untergeordneter Bedeutung waren, wurden auch diese speziell optimiert. Dabei konnten ohne nennenswerten Verlust an spezifischen Produkten Imidazol-Konzentrationen verwendet werden, die deutlich über den Empfehlungen der Hersteller lagen. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den Fragmenten um Dimere handelt, die theoretisch doppelt gesichert an die Matrix binden können.

Das Protokoll sollte sich daher zukünftig in gleicher Weise auch auf Fragmente anwenden lassen, die in niedrigeren intrazellulären Konzentrationen exprimiert werden. Eine systematische Abhängigkeit der Ausbeute an speziellen Proteinen konnte für den Präparationsschritt der Affinitätschromatographie nicht beobachtet werden; eher zeigte die molare Menge an präpariertem Protein, dass unterschiedliche Fragmente ähnlich effektiv gebunden werden. Individuelle Schwankungen konnten jedoch in Abhängigkeit von der Anzahl der Wiederverwendungen der Matrix verzeichnet werden; Zielprotein wird zunehmend schlechter gebunden. In Anbetracht der Ausbeuten von durchweg mehreren Milligramm Protein aus lediglich 100 ml Kultur kommt der Bindungseffektivität jedoch keine entscheidende Bedeutung zu.

Das Erreichen gänzlich unterschiedlicher Expressionslevel für verschiedene Proteine ist bei sonst gleichen Bedingungen ein bekanntes Phänomen. In diesem Zusammenhang spricht man von potentieller "Toxizität" der Produkte, d.h. es kommt zu einer irgendwie gearteten Interferenz mit dem Wirtsmetabolismus. In Grenzen konnte eine Abhängigkeit des Expressionslevels von der Natur der Fragmente auch im vorliegenden Rahmen beobachtet werden.

So wird das lediglich um 26 C-terminale Aminosäuren von 2-19 unterschiedliche Fragment 2-18 in gleichen Wirtszellen schlechter hergestellt, ein Effekt, der sich bei den N-terminal längeren Pendants nicht zeigt. Bei letzteren hingegen scheint schon das Fehlen von 5 C-terminalen Aminosäuren (3-1 verglichen mit 3-18) eine geringere Akzeptanz hervorzurufen. Für die hier vorgestellten Proteine konnte dies problemlos durch Wechsel des Wirtsstamms kompensiert werden, zeigt aber, wie scheinbar geringe Unterschiede deutliche Wirkung hervorrufen können. Nur so ist es zu erklären, dass in keinem publizierten Fall der Expression von LMM unterschiedlicher Herkunft oder Teilen desselben annähernd diese Level erreicht werden konnten. Als direkt vergleichbar ist hier die Expression von Karpfen-LMM über das gleiche System zu nennen (Kakinuma *et al.*, 1997), bei der die Autoren einen Anteil von 10 % am Gesamtprotein finden konnten. Andere Publikationen beschreiben – allerdings mit unterschiedlichen Vektor-Systemen - Level von 1-5 % (Maeda *et al.*, 1989) oder 5-10 % (Atkinson & Stewart, 1991a). Auch im Vergleich zu verwandten Proteinen müssen also die mit Insekten-LMM-Fragmenten zu erzielenden Expressionsraten als außergewöhnlich hoch bezeichnet werden.

In Fällen, in denen extrem starke Überexpression erzielt werden kann, liegen die betroffenen Proteine meist in Form cytosolischer Einschlussverbindungen, den *inclusion bodies* vor, die aus denaturiertem Protein bestehen. Auf diese Weise ist das Bakterium gleichsam geschützt vor den Auswirkungen der Präsenz großer Mengen an Fremdprotein. Nun kann für LMM-Fragmente, die die Information für Unlöslichkeit unter physiologischen Bedingungen tragen, davon ausgegangen werden, dass sie auch im Bakterium aggregieren.

Die Möglichkeit, mit zellulären Prozessen in Konflikt zu geraten, ist dann gegeben, wenn auch Wirtspoteine in diesen Zusammenlagerungsprozess involviert sind. So zeigen *Dictyostelium*-Zellen, die zelleigenes Myosin II-LMM überexprimieren, einen Phänotyp, der Myosin II-Null-Mutanten entspricht, da das native Molekül in Aggregate integriert wird (Burns *et al.*, 1995). Hier bilden sich große, aber uneinheitliche Strukturen im Cytoplasma, während Vikstrom *et al.* geordnete Strukturen bei der Expression von Herz-MHCs in Nicht-Muskelzellen beschreiben (Vikstrom *et al.*, 1993). Der interne Zusammenhalt, die Organisation solcher Aggregate dürfte, so kann man annehmen, ebenfalls Auswirkungen auf die Verträglichkeit des betreffenden Produktes haben, indem Oligomere eine relativ größere Anzahl an Fremddomänen präsentieren als kompakte Zusammenlagerungen. Vor diesem Hintergrund sollte die Beschaffenheit solcher Aggregate in *E.coli*-Zellen näher untersucht werden. Dies wurde stellvertretend an Schnitten von pelletierten Zellen, die das Fragment 2-19 exprimieren, unternommen.

4.1.1 Fragment-Aggregate in *E.coli*-Zellen

Tatsächlich wurden hochgeordnete, kompakte Strukturen gefunden, die nahezu die gesamte Zelle füllen (Abb. 3-13). An bevorzugten Stellen zeigt ein zwei-dimensionales Beugungsmuster in der Fourier-Transformation, dass diese Aggregate von kristallinem Charakter sind. Es stand zwar zu erwarten, dass eventuelle Aggregationsformen in den Bakterien von geordneter Beschaffenheit sind, der Befund, dass sich hier 3-dimensionale Kristalle bilden können, ist jedoch sehr bemerkenswert. Sie eröffnen prinzipiell die Möglichkeit, auch hochauflösende Rekonstruktionen von LMM-Aggregaten zu erhalten, also Substrukturen bis hin zu Einzelmolekülen zu visualisieren. Im beschriebenen Fall treten zwei prominente Reflexionen auf, die eine Einheitszelle der Dimensionen $a = 19,3 \text{ nm}$, $b = 26,8 \text{ nm}$ und $\gamma = 154,6^\circ$ beschreiben. In den Rekonstruktionen treten zylinderartige Substrukturen zu Tage, die in der Breite die in den Originalen evidente Periode von $11,2 \text{ nm}$ markieren.

Trotz der niedrigen Auflösung der Rekonstruktionen wurde ein entscheidender Anhaltspunkt zum Anlass genommen, Überlegungen zur Herkunft eines solchen zylinderartigen Erscheinungsbildes anzustellen: Der in den präsentierten Bildern horizontal zu beobachtende Abstand von $11,2 \text{ nm}$ ist ebenfalls in einem speziellen Typ von Parakristallen beobachtet worden, die Insektenfilament-spezifische Beugungscharakteristika aufweisen (Kap. 4.3.4). Zudem könnte ein Zusammenhang zwischen der hier beobachteten axialen Beugung bei $19,3 \text{ nm}$ (6. Ordnung von 116) und der filamentspezifischen Periode von 116 nm bestehen.

So besteht die Möglichkeit, dass die hier erhaltenen Strukturen Informationen enthalten, die für den Aufbau von Insektenfilamenten von Bedeutung sind. Die Orientierung der Längsachse der Moleküle in der Vertikalen der Abb. 3-13 B-F erscheint implizit. Die Existenz filamentöser Strukturen legt diese Vermutung nahe. Der horizontale Abstand von $11,2 \text{ nm}$ ist darüber hinaus deutlich zu unterschiedlich von einer LMM-spezifischen $14,5 \text{ nm}$ -Periode, um noch als Schrumpfungs- oder Schnitt-Artefakt gelten zu können.

Wie kann nun eine über 11 nm breite Struktur zustande kommen? Mittlerweile sind weitere Objekte in jenen Schnittpräparaten untersucht worden, die andere Kristallflächen zu präsentieren scheinen. Dort entsteht eine laterale Periode von $13,8 \text{ nm}$, die in Rekonstruktionen über ebenfalls zwei prominente Beugungspunkte durch zwei Untereinheiten von je der Hälfte dieses Wertes ($6,9 \text{ nm}$) gebildet wird (Beinbrech, persönliche Mitteilung). In axialer Richtung zeigt sich in diesem Bild eine ebenfalls mittig substrukturierte Wiederholung von nahe 29 nm ($24,9 - 27 \text{ nm}$), die möglicherweise einen Bezug zur doppelten Köpfchenperiode von $14,5 \text{ nm}$ hat. Einzelne Längselemente haben dort also einen geringeren Durchmesser als jene im vorgestellten Bild erhaltenen $11,2 \text{ nm}$. Unter der naheliegenden Annahme, dass die Kristalle in verschiedenen Bakterien nicht unterschiedlich strukturiert sind, kann also gefolgert werden, dass es sich bei den hier dargestellten zylinderartigen Gebilden um Überlagerungs-

muster dünnerer Strukturen handelt. Die folgende Interpretation vermag wesentliche Eckdaten der vorgestellten Ergebnisse auf sich zu vereinigen.

Literatur, die sich mit Packungsmustern von *coiled coils* befasst, berücksichtigt stets eine Publikation von Longley, die eine engste Packung solcher Strukturen diskutiert (Longley, 1975). Longley geht davon aus, dass eine räumlich dichteste Packung aus Schichten zusammengesetzt ist, in denen Einzelmoleküle im Querschnitt um einen Drehbetrag von 90° (entsprechend einer Versetzung um $\frac{1}{4}$ Helix-Windung; s. Abb. 4-1 A) zueinander orientiert sind, was einer klassischen "knobs-into-hole"-Packung entspricht (Crick, 1953b; Rudall, 1956). Longley zeigt, dass eine dichteste Packung erreicht wird, wenn eine zweite Lage von Molekülen an einer bestimmten Position in festgelegter Drehorientierung der Einzelkomponenten relativ zur Ausrichtung der Moleküle in der ersten zu liegen kommt, nämlich 0° und wiederum 90° . Zwei Möglichkeiten bleiben für die Orientierung einer dritten Schicht, hernach wiederholt sich die Anordnung. Eine der Einheitszellen, die sich aus diesen beiden Schichtmustern ergibt, ist in Abbildung 4-1 B anhand eines Querschnittes durch jene Ebene dargestellt, in der die Oberflächen benachbarter *coiled coils* den weitesten Abstand voneinander aufweisen.

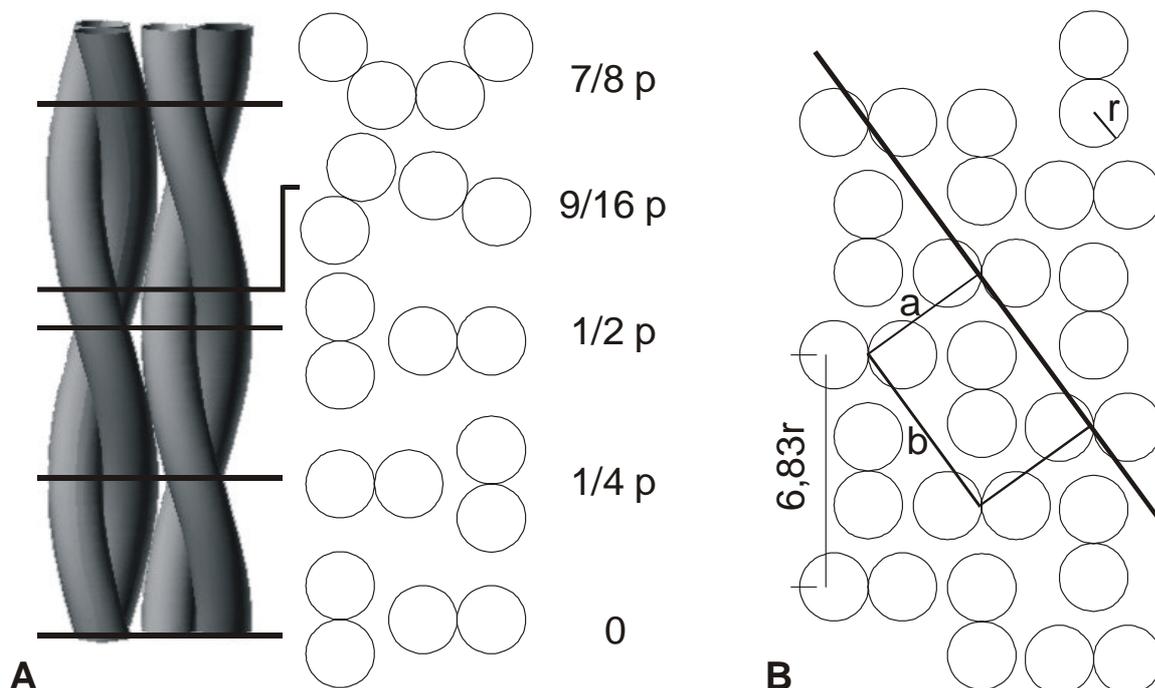


Abb. 4-1: Packung von Doppel-Helices

A: Zwei Doppel-Helices in "knobs-into-hole"-Packung mit Querschnitten durch verschiedene Ebenen entlang der Länge einer Helix-Windung (= *pitch* p): die interne Wiederholung beträgt $\frac{1}{2} p$, Kontakte zwischen den Doppelhelices, die deren Abstand bestimmen, treten an 4 Stellen an ungeraden Achsel-Positionen auf.

B: Mögliche engste Packung von "knobs-into-hole"-Schichten (vertikal orientiert) nach Longley (1975): die Einzellayer sind einheitlich gegeneinander verschoben. Die entstehende orthorhombische Einheitszelle hat Kantenlängen von $a = 4r$ und $b = 5,53r$, der Abstand gleich orientierter Doppel-Helices innerhalb einer Schicht beträgt $6,83r$ ($r = \text{Radius eines coils}$; hier: α -Helix)

Die Dimensionen dieser Einheitszelle nach Longley (r = Radius der α -Helix) sind $a = 4r$, $b = 5,53r$, $\gamma = 90^\circ$. Des Weiteren ist innerhalb einer Schicht der alternierende Wechsel von Doppel-Helices zu erkennen, wobei gleiche Orientierungen einen horizontalen Abstand von $6,83r$ haben, einzelne Längselemente die Hälfte. Die für α -Helices entwickelten Modelle können folgendermaßen für den hier vorliegenden Fall relevant sein: Setzt man $r = 2$ nm, so ergeben sich für b und den Abstand gleicher Konformationen im Layer fast exakt die oben beschriebenen 11,2 und 13,8 nm. Orientiert man sich entlang der $5,53r$ -Kristallkante, so wird erklärlich, wie ein wellenförmiges Dichte-Profil in Aufsicht entstehen kann. Die entstehenden Profile sollten dabei Polarität besitzen, wie sie auch in den Rekonstruktionen in Abb. 3-13 D und E zu beobachten ist. Es ist also möglich, die lateralen Abstände der vorgestellten Anordnung durch etablierte Modelle der Packung helikaler Strukturen unter Verwendung 4 nm dicker Elemente zu erklären, die sich umeinander winden. Die Windungslänge (*pitch*) dieser Superhelix spielt für die angestellten Betrachtungen keine Rolle. Subfilamente mit einem Abstand von 4 nm sind eine favorisierte Annahme (Wray, 1979b) zur Substruktur dicker Filamente und nicht nur bei Invertebraten (Baccetti, 1965; Beinbrech *et al.*, 1988; Beinbrech *et al.*, 1992; Pepe, 1982), sondern auch in Vertebratenfilamenten (Pepe *et al.*, 1981; Pepe, 1982; Pepe *et al.*, 1986a; Pepe & Dowben, 1977; Stewart *et al.*, 1981) direkt beobachtet worden.

Die vorgestellte Interpretation einzelner Befunde im Sinne einer Packung von Superhelices kann in weiterführenden Untersuchungen das systematische Auffinden von Einheitszellenkanten der wahllos orientierten Kristalle in *E.coli*-Schnitten erleichtern. Die Grundstruktur des Aufbaus in Longley-Packung sollte sich über Beugungen verifizieren lassen, die die Struktur im Querschnitt nach Abb. 4-1 B erfassen. Diese sollten die erwähnten Dimensionen von 11,2 und 13,8 nm beinhalten. Eine Möglichkeit bei der Weiterentwicklung dieser Ergebnisse kann die Optimierung der Fixierungsmethode darstellen. Erste Fortschritte sind bereits durch Anwendung einer alternativen Fixierungsmethode (Ashton & Pepe, 1981) zu verzeichnen (Beinbrech, persönliche Mitteilung). In verbesserten Präparaten sollte es möglich sein, genauere Einblicke in die Substruktur zu erlangen und im Speziellen das hier präsentierte Modell eines Super-coiled coils von 4nm Subfilamenten zu überprüfen, möglicherweise direkt zu visualisieren. Mikrokristalle von coiled coil-Proteinen sind schon zur Rekonstruktion bis zu einer Auflösung von einzelnen Dimeren benutzt worden (Bullough & Tulloch, 1990).

Eine mögliche physiologische Relevanz einer solchen Packung ließe sich aus Präparaten ableiten, in denen die hier vorgestellten Eckwerte in Kombination mit 14,5 nm-verwandten Perioden gefunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Parakristalle mit der Insektenfilament-spezifischen Periode von 116 nm erhalten werden, in denen ein Beugungspunkt die Beteiligung einer Strukturkomponente mit einer Breite von 11,2 nm anzeigt (s. Kap. 4.3.4). In Kombination mit der oben dargelegten Interpretation der Strukturen in *E.coli*-Zellen können

diese Befunde zur Erstellung eines Strukturmodells für das Rückgrat der dicken Filamente des Insektenflugmuskels herangezogen werden (s. Kap. 4.4).

4.2 Physiko-chemische Eigenschaften der Fragmente

Die gereinigten Expressionsprodukte wurden einer Reihe von Tests unterzogen, um deren strukturelle Integrität und biologische Funktionalität zu überprüfen. Bei der Herstellung von Molekülbruchteilen, speziell von Fragmenten eines komplexen Moleküls wie des Myosins, in Fremdsystemen sollte die Verifizierung spezifischer zu erwartender Eigenschaften einen essentiellen Teil der Etablierung eines Expressionssystems darstellen.

LMM ist in dieser Hinsicht ein vergleichsweise dankbares Untersuchungsobjekt. Als Teil des Myosinstabes stellt es eine eigene funktionelle Domäne dar, die schon seit langem unabhängig vom Gesamtmolekül untersucht wird. Es besitzt im Gegensatz zu manch anderen Fragmenten globulärer Proteine die Fähigkeit zur selbständigen Faltung zu einem α -helikalen *coiled coil*, einer sehr stabilen tertiären Struktur, die auch härteste physikalische und chemische Behandlungen vergleichsweise unbeschadet übersteht; zu nennen wären hier Hitzebehandlung und Ethanol-Toleranz. Die Voraussetzungen hinsichtlich der Primärstruktur, die eine bestimmte Sequenz mitbringen muss, um diese weit verbreitete Tertiärstruktur ausbilden zu können, sind gut charakterisiert (Parry, 1982), und die auf dieser Grundlage erstellten computergestützten Vorhersagen zur Struktur des Insekten-LMM unterscheiden sich nicht grundlegend von denen anderer LMM's (www.coils.org).

Ein zu berücksichtigender Faktor bei der heterologen Expression in Bakterien ist die Abwesenheit sekundärer Modifikationen. Glycosylierungen spielen im untersuchten Zusammenhang keine Rolle, hingegen sind Phosphorylierungen von Stabsequenzen für diverse Myosine beschrieben (Moussavi *et al.*, 1993). Die Abwesenheit spezifischer Kinasen in *E.coli* eröffnet die Möglichkeit gezielter Phosphorylierungsstudien an exprimierten Proteinen (s. Kap. 4.5.1.3).

4.2.1 Molekulargewicht

Neben der Überprüfung des Reinheitsgrades präparierter Fragmente stellt die Gelelektrophorese im SDS-System ein erstes Mittel zur Charakterisierung der Produkte über ihr Molekulargewicht dar. Innerhalb der beiden Gruppen längerer bzw. kürzerer Fragmente entsprechen die beobachteten Molekulargewichtsunterschiede nahezu exakt den Erwartungen. Die Exon 19-Fragmente komigrieren in vorhergesagter Weise mit ihren Serin-Austausch-Mutanten.

Allerdings unterscheiden sich die apparenten Molekulargewichte deutlich von den rechnerisch ermittelten. Dabei weichen die kleineren Fragmente zu einem geringeren Grad von

durchschnittlich 9 % in Richtung höheren Molekulargewichts ab als die größeren mit 15 %. Dies schließt per se einen systematischen Fehler, wie beispielsweise ein einheitliches, an sich schon sehr unwahrscheinliches Überlesen des Stopp-Codons, weitgehend aus. Insertionen, die wiederum bei allen Fragmenten einer Gruppe ähnlich sein müssten, wurden durch Sequenzierung ausgeschlossen. Die N-terminale Unversehrtheit der Proteine ist durch die Anwesenheit des Histidin-tags hinreichend belegt, C-terminale Unterschiede sind über die Wanderungseigenschaften verifiziert.

Das Phänomen der Überschätzung des Molekulargewichts wird von verschiedenen Autoren für LMM-Expressionsprodukte in ähnlicher Weise beschrieben. So sind Abweichungen zwischen 8 und 18 % von der Vorhersage bekannt (Atkinson & Stewart, 1991a; O'Halloran *et al.*, 1990). Ein abnormes Wanderungsverhalten in Form geringerer Mobilität in SDS-Gelen scheint für stabförmige und fibröse Proteine wie beispielsweise auch das Kollagen (Weitkamp, 2000) charakteristisch zu sein (Kaufmann *et al.*, 1984; Sutoh *et al.*, 1978) und wird für *coiled coil* Proteine unter anderem auf die hohe Ladungsdichte zurückgeführt (Warrick *et al.*, 1986). Zieht man den Umstand in Betracht, dass ein ähnliches Verhalten auch bei tripelhelikalen Kollagen-Motiven vorliegt, so kann ein residualer Effekt nicht komplett denaturierter Sekundärstruktur nicht ausgeschlossen werden.

4.2.2 Moleküllänge

Zur Überprüfung der strukturellen Beschaffenheit der LMM-Produkte wurde zunächst eine Moleküllängen-Bestimmung über die Rotationsbedampfung von Einzelmolekülen durchgeführt. *Coiled coil*-Proteine sind dabei als stabförmige Strukturen sichtbar. Die erhaltenen Längenhistogramme legen zwei Schlussfolgerungen nahe: Zum einen belegt das Gauß'sche Erscheinungsbild eine relativ homogene Verteilung, d.h. es scheinen keine Subpopulationen von Molekülen unterschiedlicher Länge vorzuliegen. Solche könnten beispielsweise durch Proteolyse, aber auch durch variable Konformationszustände verursacht werden.

Auf der anderen Seite zeigt eine nicht zu vernachlässigende Standardabweichung von durchschnittlich 10 % die Grenzen der Methode auf. Entweder verursacht durch Messungenauigkeiten bei der Auswertung der Negative, oder aber schon primär bedingt durch eingeschränkte Konservierung der Struktur unter den Vakuumbedingungen, ist eine relativ breite Streuung zu beobachten, die jedoch, abgesehen von der Standardabweichung für die 3-19 G-Messungen, numerisch ähnlich ist, ein Anzeichen für eine methodisch bedingte Ursache. Um eine direkte Vergleichbarkeit der Proteine sowohl untereinander als auch mit der Literatur zu schaffen, wurde ein Aminosäure-bezogener Wert als Charakteristikum für die relative Länge festgestellt, der dem helikalen Anstieg von einem α -C-Atom zum nächsten in der gegebenen Konformation entspricht; im Weiteren wird dieser Wert als h bezeichnet.

Die Gesamtheit aller dieser Mittelwerte ($\bar{h} = 0,1458$ nm) steht in guter Übereinstimmung (bis max. -3 %) mit der Vorhersage von $h = 0,1485$ nm für α -Helices und *coiled coils* (Fraser & MacRae, 1973). Im Idealfall sollte, bedingt durch die Partikelanlagerung, eher eine Tendenz zu Messwerten oberhalb der Vorhersagen, die sich aus Röntgendiffraktionen an nativem Material herleiten (Crick, 1953a), zu verzeichnen sein. Eine negative Abweichung kann verschiedene Ursachen haben. Grundsätzlich ist nicht auszuschließen, dass die extremen Druckbedingungen, unter denen die Produktion der Replika erfolgt, Schrumpfungartefakte verursachen. Der durchschnittliche Wert für h aller hier vermessenen LMM-Fragmente ist ganz im Sinne dieser Interpretation nahezu identisch mit dem von Atkinson und Stewart (1991) für drei verschiedene Expressionsprodukte bestimmten ($\bar{h} = 0,1463$); andererseits wird von noch deutlich niedrigeren Werten unter $0,14$ nm für h berichtet (O'Halloran *et al.*, 1990), die noch immer als nahe an der Theorie angesehen werden; hier mag die Unterschiedlichkeit der Bedampfungsanlagen eine Rolle spielen.

Ein zu berücksichtigender Unsicherheitsfaktor sind C-terminale Sequenzen, die nicht in α -helikaler Konformation vorliegen. Die durch sie verursachten Längenunterschiede sind kaum abzuschätzen, da sie im Extremfall gar keine Metallablagerung induzieren, trotzdem aber in die obige Berechnung mit einfließen. Ein Ausschluss dieses Faktors, d.h. Annahme einer gleichen Anzahl von Aminosäuren in α -helikaler Konformation (nach www.coils.org) für alle Fragmente einer Größengruppe führt jedoch zu einer schlechteren Übereinstimmung mit den beobachteten Messwerten.

Abschließend sei auf eine Beobachtung verwiesen, deren Signifikanz noch zu überprüfen bleibt: die kleineren Fragmente liegen mit einem Durchschnittswert von $0,148$ für h erkennbar über dem entsprechenden Wert bei den längeren Fragmenten ($0,144$); das Fragment 2-19 bildet dabei noch eine Ausnahme, ohne die der Unterschied noch sehr viel deutlicher ausfiele. Die einfachste Erklärung liegt darin, dass sich die Anlagerung von Bedampfungspartikeln einheitlicher Größe von ca. $2-3$ nm und der dadurch verursachte Fehler bei kleineren Fragmenten prozentual stärker auswirkt und zu relativ größeren Längen (damit h) führt. Allerdings müsste man einen Korrekturwert von 5 nm subtrahieren bis man auf eine einheitliche Größe für h stößt, während in den Fällen, in denen korrigiert wird, die einfache Partikelgröße verwendet wird (Lowey *et al.*, 1969). Ob dies einen Hinweis auf strukturelle Unterschiedlichkeit unter Bedampfungsbedingungen darstellt, müsste, wie erwähnt, noch abgesichert werden. Immerhin sind die verbleibenden Unterschiede so gering, dass sie mit den erwähnten Standardabweichungen auf der Grundlage dieser Ergebnisse noch als nicht signifikant einzuordnen sind.

Der Hinweis auf diesen Umstand geht vor allem darauf zurück, dass CD-Messungen in ähnlicher Weise eine Verschiedenheit der beiden Gruppen unterschiedlich langer Expressionsprodukte anzudeuten scheinen:

4.2.3 α -Helix-Gehalt

Alle Fragmente zeigen das für α -helikale Proteine charakteristische CD-Profil mit einem positiven peak um 193 nm und einer doppelschultrigen, negativen Bande zwischen 200 und 240 nm, deren Minima bei 208 und 222 nm liegen. Es ist jedoch statistisch (t-Test) signifikant, dass die Gesamtheit der kleineren Fragmente niedrigere MRE-Werte bei der zur Charakterisierung des α -Helix-Gehalts herangezogenen Wellenlänge von 222 nm aufweist. Es handelt sich zwar speziell im Fall der kleineren Fragmente um Einzelmessungen, die jedoch in Kombination als Gruppe gesehen werden können, da sie sich in einem Merkmal, dem Fehlen der MHC3-Domäne, von den anderen unterscheiden, d.h. man betrachtet hier den durchschnittlichen Einfluss dieser Domäne. Demzufolge hätte diese einen stabilisierenden Einfluss auf die Konformation in Richtung höheren α -Helix-Gehalts.

Nach Yang *et al.* (1986), der einschlägigen Referenz zur Abschätzung der Proteinkonformation über CD-Spektroskopie, liegt der MRE_{222} -Wert für 100 %ig α -helikale Konformation um $-36000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ (Yang *et al.*, 1986). Mit diesem Bezugspunkt ergibt sich der zunächst unerwartete Befund, dass auch die offensichtlich stabileren, langen Fragmente einen Helix-Gehalt von lediglich 70-80 % aufweisen, die kürzeren einen noch niedrigeren von durchschnittlich ca. 50 %.

Es zeigt sich jedoch beim Abgleich mit Literatur-Daten, dass dies ein allgemein zu beobachtender Trend bei der heterologen Herstellung von LMM zu sein scheint. Da die längeren Fragmente nahezu der vollen LMM-Länge entsprechen, ist ein direkter Vergleich mit Kaninchen- und Karpfen-LMM möglich: Konventionell präpariertes Kaninchen-LMM (Lowey *et al.*, 1969) zeigt mit über 90 % einen deutlich höheren Helix-Anteil als exprimiertes mit eben jenen 70-80 % (Maeda *et al.*, 1989). Desgleichen beschreiben Kakinuma und Kollegen (1997) einen ähnlich niedrigeren α -Helix-Anteil für LMM-Expressionsprodukte von Karpfen-Myosin (wiederum 70-80 %) verglichen mit nativem LMM (größer 90 %) (Nakaya *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass die Anzuchtbedingungen speziell im Hinblick auf die Temperatur von im vorliegenden Fall 37°C einen Einfluss auf die korrekte Ausbildung der Sekundärstruktur haben könnten (Kakinuma *et al.*, 1997). Dabei kommen zwei Erklärungsmöglichkeiten in Betracht: Entweder ist die Gesamtstruktur des exprimierten Proteins betroffen, d.h. jedes Monomer wiese mindestens partiell abweichende oder gar inkorrekte Faltung auf, oder aber ein gewisser Anteil der präparierten Proteine liegt vollständig denaturiert vor. Ein natürliches Gleichgewicht von Konformationszuständen erscheint im Hinblick auf die Ergebnisse an nativen LMM-Präparationen unwahrscheinlich.

Für den erstgenannten Extremfall einer irreversibel inkorrekten Faltung in bestimmten Molekülabschnitten sollte die Ausbildung charakteristisch geordneter Parakristalle nicht möglich sein. Da dies nicht der Fall ist, wohl aber vereinzelt ungeordnete Protein-Koagulationen im EM beobachtet wurden, darf angenommen werden, dass unter den gewählten Präparations-

und Pufferbedingungen ein gewisser Anteil des exprimierten Proteins in denaturiertem Zustand vorliegt. Dies sollte sich auch in Sedimentationsversuchen niederschlagen und es wird weiter unten ein analoger Effekt diskutiert werden.

Unter der Annahme eines gemeinsamen systematischen Fehlers sind nun aber die Unterschiede zwischen langen und kurzen Fragmenten noch nicht ausreichend erklärt. Als eine Unsicherheit in der Bestimmung des MRE-Wertes ist die Methode der photometrischen Konzentrationsbestimmung zu nennen. Sie wurde hier gewählt, um eine möglichst spezifische Determination durch Bezug auf die jeweilige Aminosäurekomposition nach Pace (1995) zu gewährleisten. Allerdings weisen die kurzen Fragmente keine Tryptophan-Reste auf, die zum wesentlichsten Teil die Absorption bei 280 nm bestimmen, so dass hier die Konzentrationsbestimmung Ungenauigkeiten aufweisen kann (Pace *et al.*, 1995). In welcher Richtung dies zu Buche schlägt, ist schwer zu prognostizieren, da auch die Lösungsmittelexposition der dann entscheidenden Tyrosin-Reste einen Einfluss hat, also schon an dieser Stelle die Konformation mit ausschlaggebend ist. In einem synergistischen Effekt könnte dies zu einer deutlichen Absenkung des Signals führen. Durch den niedrigen Extinktionskoeffizienten für die kurzen Proteine wirkt sich der Abzug des Streusignals bei 333 nm überproportional auf die MRE-Berechnung aus. Dies würde aber zu einer Überschätzung des MRE-Wertes führen, das reale Signal wären also noch geringer. Eine Abhängigkeit des CD-Signals von der Kettenlänge der vermessenen Proteine (Chen *et al.*, 1974) spielt in den hier vorliegenden Größenordnungen keine Rolle mehr.

In letzter Einschränkung kann nicht ausgeschlossen werden, dass die kleineren Fragmente unter diesen Bedingungen eine verstärkte Tendenz zur Oligomerisierung aufweisen, was sowohl die Konzentrationsbestimmung als auch das CD-Signal beeinflussen würde. Nehmen nun die kürzeren Fragmente eine im Mittel andere Konformation unter den Versuchsbedingungen an? Es wäre schwer nachzuvollziehen, warum diese in extremer Weise zur vollständigen Denaturierung neigen.

Die vorgestellten Messungen könnten also mit den aufgezeigten Einschränkungen als ein Hinweis darauf interpretiert werden, dass unter den gewählten Bedingungen in den C-terminalen zwei Dritteln des Insekten-LMM eine vom MHC3-Abschnitt verschiedene Konformation vorliegt. In diesem Sinne würde eine gelockerte Struktur dann auch zur Bestimmung relativ größerer Moleküllängen (Kap. 4.2.2) führen.

Über die oben diskutierten Messungen hinaus wurde in einem Einzelfall (3-19) der Einfluss zweiwertiger Ionen auf das CD-Profil getestet. Magnesium scheint dabei keinen Effekt auszuüben, während Kalzium zu einer anfänglich dramatischen Absenkung des Signals bei 222 nm führte, das sich im Anschluss allmählich zu erholen schien. Dieser Effekt ist besonders im Hinblick auf die Tatsache, dass Magnesium-Ionen keinerlei Wirkung zeigen, sehr bemerkenswert. Wäre es ein allgemein durch zweiwertige Ionen verursachte Änderung, so

läge eine plausible Erklärung auf der Hand: Durch Ausbildung von Ionenbrücken, die in diesem Fall Interaktionen von Orten ähnlicher Nettoladung ermöglichen (Parry, 1981), sind diese Agentien in der Lage, die Löslichkeit von *coiled coil*-Proteinen herabzusetzen. So werden sie beispielsweise als Präzipitationshilfe zur Absenkung der Löslichkeit (Stewart, 1984) bei der Induzierung von Tropomyosin-Kristallen eingesetzt. Allerdings haben Magnesium (Caspar *et al.*, 1969) und Kalzium (Longley, 1977) dabei einen ähnlichen Effekt, da dieser lediglich auf dem Abgleich benachbarter Negativ-Ladungen zu beruhen scheint (Cohen *et al.*, 1972).

Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von Kalzium auf die Eigenschaften von *coiled coil*-Proteinen ist eine durch physiologische Konzentrationen verursachte Absenkung der Löslichkeit bei Paramyosin (Merrick & Johnson, 1977). Es besteht also die Möglichkeit, dass die Zugabe von Kalzium eine Aggregationstendenz oder zumindest Oligomerisierung in Gang setzt, die sich nach gewisser Zeit auf einem Gleichgewicht einpendelt. Ein tatsächlicher Einfluss auf Konformationszustände - lokal oder global - bliebe noch zu verifizieren. Insgesamt bleibt allerdings rätselhaft, warum Magnesium diesen Effekt nicht zeigt. Da es sich bei Kalzium um den Trigger der Muskelkontraktion handelt, könnte jedweder Einfluss auf Eigenschaften von Muskelproteinen von potentieller Bedeutung sein.

So wäre theoretisch denkbar, dass die Aktivierung des Insektenflugmuskels auch mit strukturellen Veränderungen im Schaft der dicken Filamente einhergeht: Anders als in Vertebraten-Muskeln verschwindet nämlich die Myosinfilament-eigene 14,5 nm-Reflexion im erschlafften Zustand in Beugungsdiagrammen von Fibrillen in Kontraktionslösung (Reedy *et al.*, 1987). Allerdings handelt es sich bei den hier verwendeten Konzentrationen um unphysiologische Verhältnisse, so dass diese Beobachtung noch eines weitergehenden Studiums bedarf.

4.2.4 Löslichkeit

Zur abschließenden Charakterisierung der Expressionsprodukte wurde deren Löslichkeit im standardmäßig zur Aggregation eingesetzten Puffersystem über einen Sedimentations-assay bestimmt, der als eigentlicher biologischer Funktionalitätstest angesehen werden kann (Kap. 3.3.4). Schon 1969 konnte Lowey etablieren, dass die Unlöslichkeit von Myosin bei physiologischen Ionenstärken vollständig durch die LMM-Domäne des Moleküls determiniert wird (Lowey *et al.*, 1969). Der ebenfalls zum *coiled coil* gefaltete S2-Abschnitt ist hingegen löslich, obgleich keine offensichtlichen Unterschiede in der Motivabfolge der Primärsequenz vorliegen.

Die Löslichkeitsprofile über einen weiten Bereich von Ionenstärken zeigen für alle in diesen Studien exprimierten Fragmente ein sigmoides Profil, wobei das Maximum der sedimentierbaren Anteile bei physiologischen Salzkonzentrationen von 150 mM durchweg nahezu oder vollständig erreicht ist. Das heißt, alle Produkte tragen die Information für die Unlöslichkeit

unter zellulären Bedingungen und verhalten sich entsprechend den Erwartungen für vollständiges LMM, das hier annähernd durch die C-terminal vollständigen 3er-Fragmente repräsentiert ist. Gemeinsam ist allen Profilen auch, dass weder eine vollständige Ausfällbarkeit noch eine vollständige Löslichkeit über den gewählten Konzentrationsbereich zu verzeichnen ist. In beiden Fällen könnten Denaturierungseffekte eine Rolle spielen.

Wie oben anhand der CD-Messungen diskutiert, gibt es Hinweise, dass eine Fraktion von Expressionsprodukten, die durchaus 10 % und mehr ausmachen kann, nicht korrekt gefaltet präpariert wird. Da die Proben vor der Aufnahme der CD-Spektren zentrifugiert wurden und keine nennenswerte Trübung (photometrisch bestimmt) aufwies, sollte es sich dabei größtenteils um komplett entfaltete Spezies handeln, die im Löslichkeitsversuch nicht sedimentierbar ist. Atkinson *et al.* (1991) diskutieren für nicht pelletierbare Anteile eine kritische Aggregationskonzentration von ca. 25 µg/ml bei vergleichbarer Fragmentgröße (Atkinson & Stewart, 1991a), was den hier beschriebenen, nicht sedimentierbaren Anteilen nahezu entspricht.

Andererseits wurde durchaus 100 %ige Ausfällbarkeit für LMM und Fragmente beschrieben (Sohn *et al.*, 1997; Szent-Györgyi, 1953), was vermuten lässt, dass das Gleichgewicht unter Niedrigsalzbedingungen sehr weit auf der Seite der aggregierten Form liegt. Es kann aber vorausgesetzt werden, dass die Zentrifugationsbedingungen das Ergebnis wesentlich beeinflussen; Kleinstaggregate bzw. Oligomere können unter den gewählten Bedingungen nicht sedimentiert werden.

Die nicht vollständige Solubilisierung bei hohen Ionenstärken kann durch Koagulationseffekte denaturierten Proteins und Adsorptionsverlust an der Dialysemembran erklärt werden. Die gemeinsame Unlöslichkeit der Fragmente bei niedrigen Ionenstärken lässt den Schluss zu, dass wesentliche Determinanten der Unlöslichkeit von Insekten-LMM im Bereich der MHC1- und/oder MHC2-Subdomänen lokalisiert sind. Ergänzende Versuche mit MHC1-Fragmenten grenzen diesen Bereich weiter auf den C-terminalen MHC1-Abschnitt ein (Ziegler, persönliche Mitteilung). Dass C-terminale Sequenzen essentiell an der Bestimmung der Löslichkeit beteiligt sind, ist in vielen Studien belegt (Cross & Vandekerckhove, 1986; King *et al.*, 1995; Nyitray *et al.*, 1983; Wick *et al.*, 1997).

Darüber hinaus häufen sich Hinweise, dass sehr kurze Abschnitte innerhalb der *coiled coil*-Sequenzen des LMM unterschiedlicher Herkunft für dessen Löslicheigenschaften entscheidend verantwortlich sind (Lee *et al.*, 1994; Sohn *et al.*, 1997). Sohn und Mitarbeiter (1997) definieren eine "Assembly Competent Domain" von lediglich 29 Aminosäuren, die in der Lage ist, in chimären Konstrukten löslichen Fragmenten Sedimentierbarkeit zu verleihen und deren Fehlen eine Solubilisierung des mutierten Fragments nach sich zieht. Die homologe Sequenz des *Drosophila*-Stabes mit exakt demselben Ladungsmuster ist im C-terminalen Drittel des MHC1-Abschnittes lokalisiert.

Über die generelle Unlöslichkeit hinaus konnten bei den hier exprimierten Fragmenten jedoch Unterschiede gefunden werden, die zeigen, dass Unlöslichkeit nicht notwendigerweise dem Alles-oder-nichts-Prinzip folgt: Übereinstimmend sind sämtliche N-terminal längeren Fragmente löslicher als ihre kleineren Entsprechungen. Dies zeigt zweierlei: zum einen ist die Löslichkeit einer LMM-Sequenz ein Ergebnis aus dem Zusammenspiel multipler Faktoren und Beiträgen unterschiedlicher Subdomänen. Zum anderen wird ein Punkt unterstützt, den Atkinson (1991) aus der Untersuchung von Deletionsmutanten von Kaninchen-LMM folgert: das 28 Aminosäure-Ladungs-Raster entlang des Stabes und entsprechende Ladungskomplementierung zwischen benachbarten Molekülen sind nicht die treibende Kraft für die Zusammenlagerung von Myosin (Atkinson & Stewart, 1991b). Im vorliegenden Fall würde dies nämlich als kooperativer Effekt zur Absenkung der Löslichkeit längerer Fragmente führen.

Die in dieser Arbeit hergestellten C-terminalen Deletions- und Isoformen zeigen bei gegebenem N-Terminus nahezu identische Löslichkeiten, die Aminosäuren bis einschließlich des Glycins 6 Positionen vom C-Terminus der Exon 18-Isoform haben also keinen Einfluss auf diese Eigenschaft des LMM. Für das Kaninchen-LMM hingegen konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von 17 Aminosäuren einer C-terminalen *random coil*-Domäne ein 30-kDa-Fragment solubilisiert (Maeda *et al.*, 1991). Der erste Helix-brechende Glycin-Rest der *Drosophila*-Sequenz liegt noch weitere 8 Aminosäuren aufwärts des C-terminal kleinsten hier untersuchten Fragments; ein entsprechend verkürztes Fragment könnte also die Frage beantworten, ob auch beim Insekten-LMM *random coil*-Sequenzen die Löslichkeitseigenschaften mit determinieren.

Das Einfügen einer Extra-Ladung in eine *random coil* Sequenz aber ändert das Verhalten der Exon 19-Isoformen (Ersatz eines Serin-Restes durch einen Glutamat-Rest) erkennbar. Es kann vermutet werden, dass diese zusätzliche negative Ladung direkt oder indirekt mit der Ausbildung von Ionenbrücken an anderer Stelle der Aggregate interferiert. Auch unter physiologischen Ionenbedingungen ist geringfügig weniger Material der Mutanten pelletierbar. Ob dies aber *in vivo* von Relevanz sein könnte, sollte durch weitere Versuche geklärt werden: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist versucht worden, Hinweise auf eine mögliche Phosphorylierbarkeit des mutierten Serin-Restes durch *Drosophila*-Kinasen zu finden (s. Kap. 4.5.1.3).

Die geringere Löslichkeit kurzer im Vergleich zu N-Terminal längeren Fragmenten deutet auf eine Verschiedenheit in der Art der Selbstassoziation der beiden Gruppen. Derartige Unterschiede sollten sich ebenfalls in den Aggregationsformen widerspiegeln, die Gegenstand des nächsten Kapitels sind.

4.3 Fragment-Aggregate

LMM und seine unlöslichen Teilstücke können in Abhängigkeit von einer ganzen Reihe von Parametern wie der Moleküllänge, der Herkunft des Elternmoleküls (Nakamura *et al.*, 1971), pH (Katsura & Noda, 1973), der Ionenstärke (Podlubnaia, 1973) und der Art der Absenkung des Salzgehaltes (Chowrashi & Pepe, 1989) sehr unterschiedliche Parakristallformen ausbilden. Interpretationen der verschiedenartigen Ausprägungen werden seit langem (Huxley, 1963) dazu herangezogen, Informationen über den Aufbau des Filamentrückgrates zu gewinnen. Der Polymorphismus von möglichen Strukturen zeigt sich am deutlichsten durch Beobachtungen nicht nur von flächigen oder spindelförmigen Parakristallen, wie sie hier erhalten werden konnten, sondern auch von Netzen, in denen Bündel von Molekülen in regelmäßiger Weise untereinander verwoben sind (Katsura & Noda, 1973; Lowey *et al.*, 1967; Nakamura *et al.*, 1971; Yagi *et al.*, 1981).

Fast durchweg werden Aggregate von LMM über die Technik der Negativkontrastierung ("negative staining") untersucht. In derartigen Präparaten erscheinen hohe Proteindichten heller als Zonen niedriger Dichte, da sich in letzteren Regionen elektronendichtes Kontrastierungsmaterial sammeln kann. Aufgrund dieses Verhaltens können durch die Analyse von geordneten Strukturen Rückschlüsse auf die molekularen Versetzungen von Einzelmolekülen im Verbund angestellt werden.

Bis zu einer endgültigen Klärung der Molekülorganisation über hochauflösende Kristallrekonstruktionen, die bislang an der Nichtverfügbarkeit genügend geordneter Präparate scheiterte, können solche Interpretationen als Modelle angesehen werden, die sich zum Beispiel durch ihre Übertragbarkeit auf Parakristalle anderer LMM-Varianten bestätigen lassen: liefert ein gegebenes Interaktionsschema auch für Molekülfragmente abweichender Länge eine adäquate Beschreibung des experimentell erhaltenen Musters, so ist dies ein deutlicher Hinweis auf die Validität des Modells.

Ein klassisches Beispiel einer Analyse einer 43 nm-periodischen Parakristallform von Skelettmuskel-LMM stellt die Arbeit von Pauline Bennett dar (Bennett, 1981), deren im wesentlichen eindimensionale Deutung in der Folge von Yagi & Offer (1981) im Hinblick auf die Molekülorganisation in drei Dimensionen aufgegriffen und erweitert wurde (Yagi & Offer, 1981). Dieses Modell konnte später direkt zur Erklärung eines Parakristalls einer kürzeren LMM-Form herangezogen werden (Strzelecka-Golaszewska *et al.*, 1985). Die Arbeit mit proteolytischen Spaltprodukten birgt jedoch eine gewisse Unsicherheit in Bezug auf die exakte Natur der Präparation. So bleibt eine Restunsicherheit hinsichtlich des exakten N-Terminus des verwendeten Moleküls. Hier liegt einer der wesentlichsten Vorteile der Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Gewinnung von LMM-Bruchstücken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Aggregate mit unterschiedlichen periodischen Charakteristiken, allesamt Vielfache des Köpfchenabstandes von 14,5 nm, erhalten. Die beobachteten Perioden reichen dabei von bekannten 43,5 und 14,5 nm-Abständen, über selten beschriebene 58 nm-Charakteristiken bis hin zu hochspezifischen 116 nm-Mustern, die eine direkte Verbindung zur Struktur des Insektenfilaments aufzeigen. Die Interpretationen der Aggregationsmuster können also in Kombination zur Ableitung von Modellen zur Filamentstruktur herangezogen werden.

4.3.1 Das 43,5 nm-Muster

Es liegt nahe, die weithin anerkannte Interpretation eines 43,5 nm-Musters nach Bennett als Grundlage zur Deutung der hier mit den Fragmenten 3-19 und 3-19G erhaltenen Parakristalle heranzuziehen. Abb. 4-2 A stellt die von Bennett angenommene Kombination von ca. 90 nm langen Molekülen dar. Die sich wiederholende Einheit besteht schematisch aus 2 polaren Anordnungen aus je 3 Molekülen, die antiparallel zueinander orientiert sind. Die Molekülversetzungen innerhalb der parallelen Komponenten betragen 43 nm, so dass sich bedingt durch die Moleküllänge ein ca. 4 nm (Differenz der Länge und der zweifachen Grundversetzung) breiter zusätzlicher Überschneidungsbereich ergibt, der im negativ gefärbten Parakristall zur Ausbildung eines hellen Streifens führt. Versetzt man nun die zweite entgegengesetzt orientierte Lage von Molekülen derart, dass diese Region im Abstand von ca. 3-4 nm vom Überschneidungsbereich der ersten Lage zu liegen kommt, so erhält man das von Bennett beobachtete Bänderungsmuster: ein sich im Abstand von 43 nm wiederholendes Motiv von zwei ca. 3 nm breiten hellen Bändern, die durch einen zentralen dunkleren Abschnitt voneinander getrennt sind und so ein spiegelsymmetrisches Muster ergeben. Diese Symmetrie ist integraler Bestandteil aller Modelle, die polare Komponenten antiparallel anordnen. Bennett leitet ferner aus der Analyse von Parakristall-Enden ab, dass von den verschiedenen möglichen antiparallelen Interaktionen – die Darstellung in Abb. 4-2 A betont nur bestimmte - eine Überschneidung („overlap“) von 84 nm von besonderer Bedeutung sein muss. Für die folgenden Überlegungen sind also zwei Beziehungen hervorzuheben:

- a) die Breite der hellen Streifen ergibt sich aus: Moleküllänge (90 nm) – 87 nm = 3 nm;
- b) die Breite der zentralen dunklen Zone lässt sich in dieser Darstellung herleiten als:

$$87 \text{ nm} - \text{antiparalleler } \textit{overlap} (84 \text{ nm}) = 3 \text{ nm}.$$

Das in Abb. 3-23 dargestellte Bandenmuster einer 43,5 nm-Periode, das mit dem Fragment 3-19 und deren Mutante erhalten wurde, stimmt im Grundaufbau mit dem oben skizzierten überein: Auch hier finden sich spiegelsymmetrisch angeordnete schmale Überschneidungsbereiche hellerer Färbung, die von einer zentralen dunklen Zone getrennt werden. Die oben dargelegten Beziehungen lassen dann folgende Schlüsse zu: Aufgrund der Breite der hellen Streifen von 4,5 nm sollten die Moleküle ca. 91,5 nm lang sein.

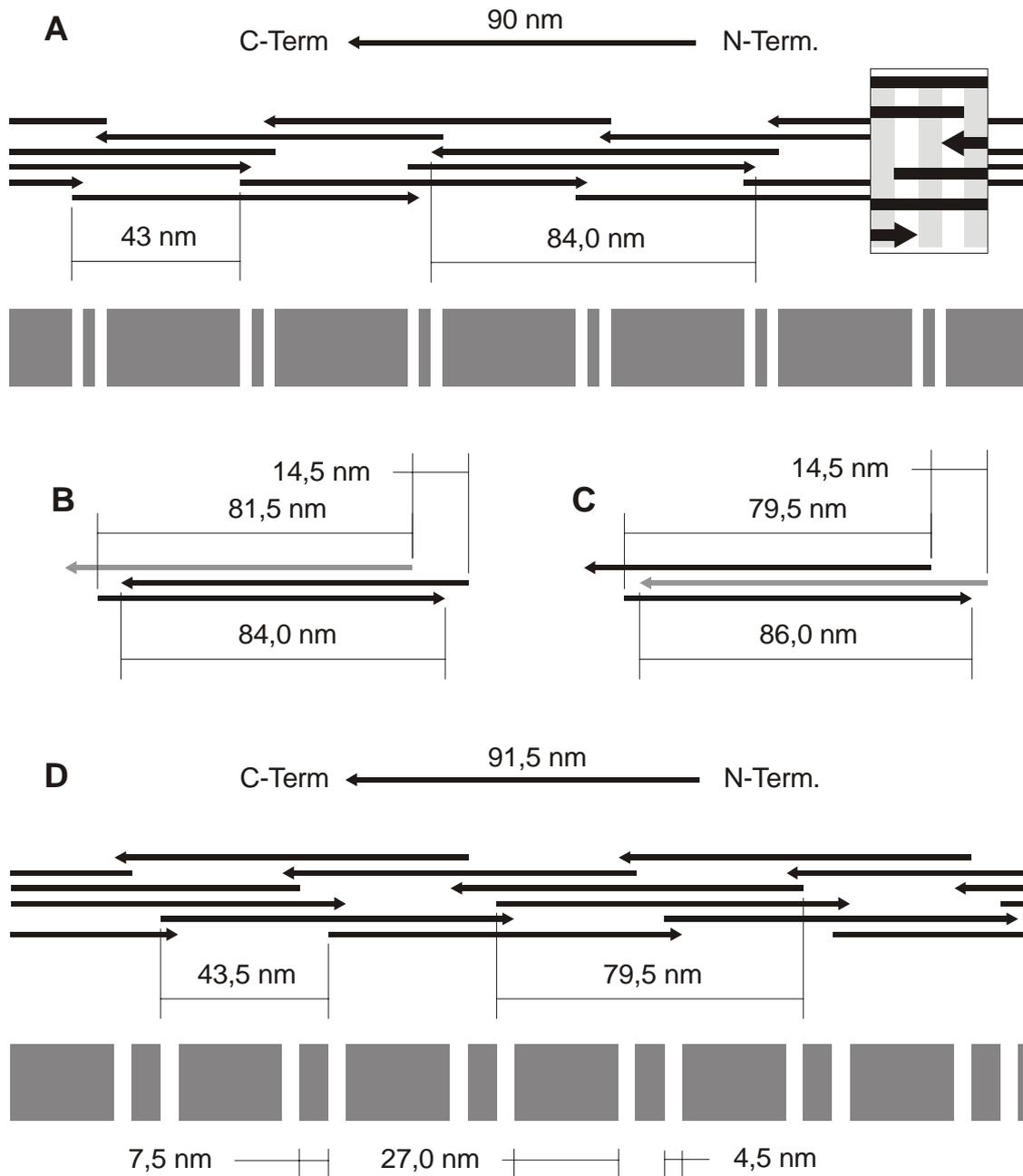


Abb. 4-2: Herleitung eines Molekülmodells zur 43,5 nm-Periode des Fragments 3-19

Die Polarität der Einzelmoleküle wird durch Pfeilspitzen (C-Terminus) angedeutet. B und C veranschaulichen den Übergang von A nach D.

A: Molekülmodell zur 43,5 nm-Periode in Parakristallen von Vertebraten-LMM (90 nm) nach Bennett (1981); Vergrößerung zeigt den Bereich der C-N-Überlappungen, die im Dichteprofil zu protein-dichteren helleren Bereichen führen.

B: Antiparallele Überlappung von 84 nm nach Bennett. Der graue Pfeil weist auf eine antiparallele Überlappungsmöglichkeit, die im Bennett-Modell nicht eingeschlossen, aber in C berücksichtigt ist:

C: Übertragung von B auf 91,5 nm lange Moleküle und einen antiparallelen *overlap* von 86 nm (s. Text). Der graue Pfeil entspricht der von Bennett vorgeschlagenen antiparallelen Überlappung in A. Das Alternativ-Molekül aus B ergibt eine N-N-Überlappung von 79,5 nm entsprechend einer Musterversetzung von 12 nm.

D: Molekül-Modell zur Entstehung der 43,5 nm-Periode in Parakristallen von 3-19

Der antiparallele *overlap*-Bereich ergibt sich durch den 7,5 nm breiten zentralen Dunkelbereich zu 79,5 nm (s. Abb. 4-2 D).

Die abgeleitete Moleküllänge von 91,5 nm entspricht nahezu exakt der Vorhersage für ein 617 Aminosäuren langes Peptid in α -helikaler Konformation (helikaler Anstieg / ASe = 0,1485 nm nach Fraser & MacRae (1973)). Allerdings ergibt sich ein Unterschied zu der in der Rotationsbedampfung festgestellten Größe von ca. 88 nm. Es wurde schon in Abschnitt 4.2 diskutiert, dass Schrumpfungartefakte bei der Bedampfung nicht auszuschließen sind, und darauf verwiesen, dass möglicherweise C-terminale Sequenzen, die in Lösung nicht in α -helikaler Konformation vorliegen - wie der durch Exon 19 kodierte Abschnitt - über diese Methode möglicherweise nicht oder nur unvollständig detektiert werden. Insofern liegt eine positive Abweichung von 3,5 nm durchaus im Rahmen der methodisch bedingten Variation.

Schwieriger einzuordnen ist hingegen der antiparallele *overlap* von lediglich 79,5 nm. Dieser scheint zu deutlich von den von Bennett postulierten 84 nm abzuweichen, als dass hier präparationsbedingte Unterschiede verantwortlich gemacht werden könnten; dies gilt insbesondere deshalb, weil durch die 43,5 nm-Periode ein kalibrierender Abgleich der Absolutwerte in den unterschiedlichen Objekten gegeben ist.

Des Weiteren zeigen folgende Überlegungen, dass eine negative Abweichung von 84 nm auszuschließen ist: Bennett favorisiert in ihren Überlegungen einen C-terminalen *overlap*, was die Darstellung 4-2 A berücksichtigt. Sie begründet dies durch die Übereinstimmung mit Überlappungen in sogenannten Segment-Aggregaten: dies sind Bündel von Molekülen, die lediglich eine bestimmte Interaktion mit ihren Partnern eingehen, so dass beiderseits fransige Gebilde entstehen, deren zentraler Bereich der Überlappung entspricht und deren Franslänge durch die Moleküllänge bestimmt wird. Sowohl LMM-Segmente als auch Segment-Aggregate aus Stäben zeigen dabei einen zentralen *overlap* von ca. 86 nm (Cohen *et al.*, 1970; Harrison *et al.*, 1971; King & Young, 1972). Daraus leitet sich direkt eine entsprechende C-terminale Überlappung ab.

Nun weist das Fragment 3-19 des Insektenmuskel-Myosins zusätzliche C-terminale Sequenzen in Form des durch Exon 19 kodierten Bereichs auf. Würden nun homologe Bereiche der unterschiedlichen LMM-Präparationen miteinander interagieren, so würde die Anwesenheit zusätzlicher Aminosäuren zu einer Verbreiterung der C-terminalen Überlappungszone führen – vorausgesetzt sie sind im Parakristall sichtbar -, keinesfalls jedoch zu einer Verminderung des *overlaps*. Offensichtlich liegen im Fall des 3-19-Aggregats in Abb. 3-23 also Interaktionen vor, die nicht den von Bennett beschriebenen entsprechen. Sie lassen sich aber auf die in Abb. 4-2 B/C beschriebene Weise aus diesen herleiten:

Zunächst wird in Anlehnung an die oben zitierten Ergebnisse von Segment-Aggregaten von einem 86 nm-*overlap* ausgegangen. Schon der Unterschied der prinzipiellen Wiederholungsabstände der Köpfchen (Tregear *et al.*, 1984) von 14,3 nm bei Vertebraten und 14,5 nm

bei Insekten macht dieses Vorgehen plausibel. Zudem scheinen die Unterschiede hinreichend gering, um davon ausgehen zu können, dass es sich hier tatsächlich um homologe Interaktionen handelt.

Die ursprünglich betonte antiparallele Interaktion wird nun durch ein Molekül ersetzt, das relativ zum Bennett-Partner um 14,5 nm versetzt ist (grau gefärbt in Abb. 4-2 B). So ergibt sich das in Abb. 4-2 C schwarz dargestellte antiparallele Dimer. Dies steht in keiner Weise im Widerspruch zu den oben zitierten Ergebnissen, ist im Gegenteil eine konsequente Fortführung des beschriebenen antiparallelen Verhaltens, das als Modell für die Interaktionen im Bereich der "bare zone" (Köpfchen-freie Zone) der nativen Filamente angesehen wird. Dort mögen zwar speziell im Fall der Vertebraten-Muskeln Überlappungen von 84-86 nm von besonderer Bedeutung sein, jedoch sind diese nicht die einzigen, da beiderseits der *bare zone* jeder Köpfchen-Kranz von mehreren Molekülen im Abstand von 14,3 bzw. 14,5 nm besetzt ist. Das heißt, auch diese Moleküle stehen in engerem Kontakt mit antiparallel ausgerichteten Molekülen der anderen Flanke des Filaments. Mit anderen Worten, die im Bennett-Modell besonders hervorgehobene antiparallele Interaktion ist nur eine von vielen, die ein entsprechendes *bare zone*-Modell fordern muss, deren gemeinsamer Nenner eine Differenz von $n \cdot 14,3$ bzw. $14,5$ nm zu beispielsweise 84-86 nm ist. Harrison *et al.* (1971) machen in ihrem Modell auf eben diesen Umstand aufmerksam (Harrison *et al.*, 1971). Noch deutlicher werden diese Überlegungen bei der Betrachtung von 14,5 nm-periodischen Aggregaten, wie sie unten folgen, in denen multiple Interaktionen vorausgesetzt werden müssen. Trotzdem deuten diese Ergebnisse an, dass sich die bevorzugte antiparallele Interaktion von Vertebraten- und Insekten-LMM unterscheiden. Die unterschiedliche Ultrastruktur beider Filament-Typen speziell im Bereich der *bare zone* könnte also durch spezifische LMM-Eigenschaften begünstigt oder mit determiniert sein.

Mit den beschriebenen Modifikationen ergibt sich das in Abb. 4-2 D dargestellte Molekülmodell zur Erklärung des 3-19-Parakristalls aus Abb. 3-23 A. Auch hier sind also die polar ausgerichteten Moleküle um einen Betrag von 43,5 nm gegeneinander versetzt, während unter den antiparallelen Komponenten ein N-terminaler *overlap* von 79,5 nm hervorgehoben ist. Das resultierende Dichteprofil entspricht damit den Beobachtungen am Parakristall.

Der in Abb. 3-23 B dargestellte Parakristall leitet über zu den Strukturen mit 14,5 nm-Periodizität: Der spindelförmige Parakristall ist nicht mehr über die gesamte Breite uniform gebändert, axiale Versetzungen verzerren das Dichteprofil. Das Grundmuster ist eindeutig durch ein 43,5 nm-Motiv bestimmt, wie die korrespondierende FFT belegt. Über die Breite des Parakristalls stellt sich dann eine graduelle Verschiebung dieses Musters ein. Dabei greifen die einzelnen Färbungszonen weit ineinander, lassen aber das oben diskutierte Grundmuster noch erkennen. Die Musterverschiebung findet in 14,5 nm-Schritten statt und reiht sich damit in eine Vielzahl von Hybrid-Mustern ein, die immer dann beobachtet werden,

wenn LMM-Fragmente sowohl 43,5 nm- als auch 14,5 nm-periodische Strukturen ausbilden (Bennett, 1981; Chowrashi & Pepe, 1977; Strzelecka-Golaszewska *et al.*, 1985; Ward & Bennett, 1989). Dabei kann die Art des Übergangs ganz unterschiedlich sein. Oft entwickelt sich das hochfrequenteres Muster graduell in longitudinaler Richtung eines Parakristalls aus der größeren Periode, teils liegt aber auch ein laterales Ineinandergreifen von 43,5 nm-Mustern vor (Chowrashi & Pepe, 1977).

Parakristalle wie der in Abb. 3-23 B dargestellte zeigen nicht nur, dass beide Muster nahe verwandt sein müssen, sondern darüber hinaus, dass eine Basisanordnung der längeren Periode integraler Bestandteil von Parakristallen mit einer Periode im Köpfchenabstand sein kann. Allgemein wird eine Schichtanordnung zur Interpretation herangezogen, die ein 43,5 nm-Muster durch Überlagerung in eine 14,5 nm-Periode überführt, was also mindestens drei Schichten erfordert. Vor diesem Hintergrund kann also ein Molekülmodell zur längeren Periode durch seine Übertragbarkeit auf Parakristalle mit kurzer Periode validiert werden: Wenn es möglich ist, ein Ursprungsmuster durch Addition in ein 14,5 nm-Profil zu überführen, so hat man mehr als einen starken Hinweis auf die Gültigkeit des Modells für diese Fragmente.

4.3.2 14,5 nm-Muster

Kann nun die oben dargelegte Interpretation des hier vorgefundenen 43,5 nm-Musters die Bildung von 14,5 nm-Strukturen erklären? Strukturen mit Köpfchenperiode erscheinen auch bei anderen LMM-Spezies oft weniger scharf definiert (Bennett, 1981; Chowrashi & Pepe, 1977): das resultierende Muster wirkt eher diffus und erinnert in dieser Hinsicht an die in Abb. 3-24 dargestellten Parakristalle. Dieser Effekt wird leicht erklärlich, wenn man bedenkt, dass sehr viel mehr Moleküle und im Falle von kombinierten Schichtanordnungen auch mehrere Organisationsebenen erforderlich sind, um ein solches Muster zu etablieren. Der erste Eindruck eines diffusen Hell-Dunkel-Wechsels in Objekten wie denen aus Abbildung 3-24 kann hier auch durch Filterung auf die Ordnungen der Periode nicht weiter erhellt werden. Die Zonen extremer Färbungen gehen kontinuierlich über Grauabstufungen ineinander über. Sie können dabei je nach Objekt oder Lokalisation innerhalb der Struktur unterschiedliche Ausdehnung aufweisen. Dabei ist an verschiedenen Objekten eine Abhängigkeit der Graustufenverteilung innerhalb der Periode von der Dicke des Parakristalls zu beobachten (vgl. Abb. 3-25 D und G). Dies legt den Schluss nahe, dass die dreidimensionale Struktur das Erscheinungsbild der Grundperiode mit beeinflusst: von flächigen Strukturen ist ein solches Verhalten nicht zu erwarten.

Vor diesem Hintergrund kann vermutet werden, dass es sich bei diesen Parakristallen eher um zylinderförmige Strukturen als um Schichtformationen handelt. Auch das seitliche *staining*-Verhalten stützt diese Annahme: ein äußerer Saum von Schwermetall verläuft recht

ausladend in den ungefärbten Hintergrund (Abb. 3-25 A), was allerdings einen im Querschnitt polyedrischen Aufbau nicht ausschließt. Als Kernaussage der Abb. 3-24 kann festgehalten werden, dass Aggregate von C-terminal gleichen Fragmenten beider Größenklassen ein mindestens ähnliches, wenn nicht gleiches Färbungsmuster innerhalb der 14,5 nm Periode aufweisen können. Dieser Umstand wird einen weiteren Prüfstein für ein Erklärungsmodell darstellen, das an dieser Stelle jedoch noch nicht zu postulieren ist, da die interne Struktur der Periode nicht zweifelsfrei aus den Filterungen abgeleitet werden kann.

Wenn nun die Substruktur bzw. die verursachte Färbungsverteilung speziell in spindelförmigen Gebilden variiert, so ist man zur detaillierten Analyse der Dichteverteilung innerhalb der Periode auf annähernd oder perfekt flächige Anordnungen angewiesen. Kristallographisch ausgedrückt setzt dies also eine Aufsicht auf eine Kristallebene voraus, d.h. zwei Kanten der Einheitszelle liegen im rechten Winkel zur Betrachtungsrichtung. Laterale Ordnung zeigt sich in der FFT dann durch Anwesenheit von Beugungspunkten in der Fläche der Transformation. Ein solcher Fall liegt bei dem in Abb. 3-25 B dargestellten Exemplar eines Aggregats von 3-19-Fragmenten vor. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass es sich tatsächlich um polyedrische Strukturen handelt; Bennett zeigt für ihre Parakristalle an Pellet-Schnitten einen unregelmäßig polygonalen Querschnitt (Bennett, 1981). Die Chance, hinreichend ausgedehnte Flächen gleicher Ebenenausrichtung zu finden, würde mit dem Durchmesser der Objekte steigen. Ganz in diesem Sinne ist mit dem dünneren Parakristall aus Abb. 3-25 A ein ähnliches Beugungsmuster nicht zu erhalten. Es mag sich aber durchaus auch um einen präparationsbedingten Sonderfall handeln, in dem der größere der dargestellten Parakristalle durch die Färbungsprozedur lokal abgeflacht ist.

Quinlan und Stewart (1987) beispielsweise konnten sehr hochauflösende Rekonstruktionen von einem nach Uranylacetat-Kontrastierung abgeflachten Tubus aus S2-Molekülen gewinnen (Quinlan & Stewart, 1987). Unabhängig davon sind hier durch die so belegte Ordnung in mehreren Dimensionen auch verlässlichere Aussagen zur Substruktur der Periode möglich. Tatsächlich unterscheidet sich das Filterungsmuster auf die Ordnungen der Periode in Abb. 3-25 D dann auch sichtbar von denen, die mit Parakristallen geringeren Ordnungsgrades erhalten werden (vgl. Abb. 3-24 und 3-25 G), indem die Bereiche maximaler und minimaler Färbungstiefe ausgedehnter sind, ferner ein schmaler zentraler Saum innerhalb des Hellbereichs auftaucht.

Abb. 4-3 A stellt nun dar, wie sich ein solches Muster durch Kombination aus dem in Abb. 4-2 D abgeleiteten 43,5 nm-periodischen Färbungsprofil für 3-19-Fragmente konstruieren lässt: Zunächst wird das Ursprungsmuster durch sukzessive Verschiebungen um einen 14,5 nm-Betrag in ein Profil mit eben dieser Periode gewandelt.

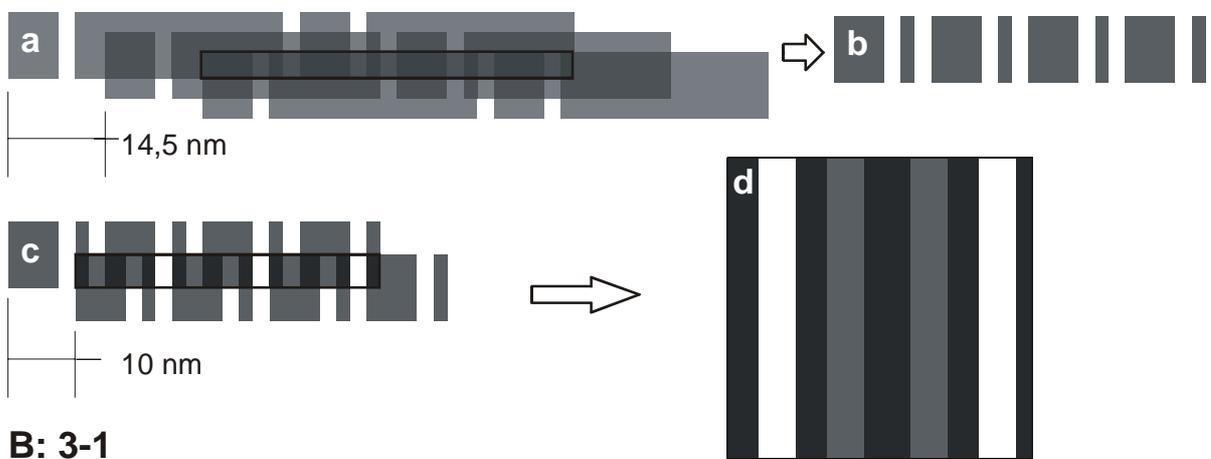
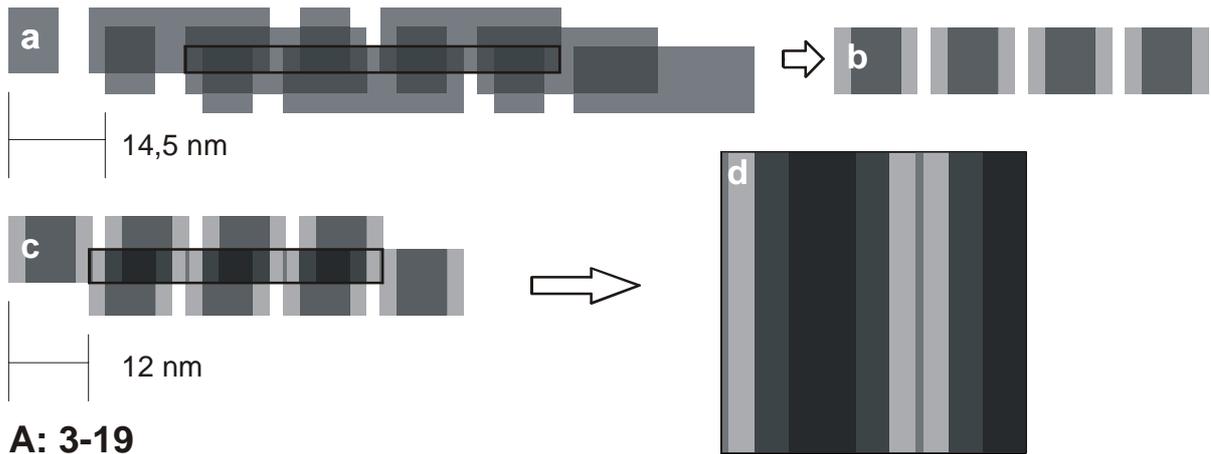


Abb. 4-3: 14,5 nm-Periode: Superpositionsmuster langer Fragmente

A: Fragment 3-19 (91,5 nm)

a: Überlagerung des Ergebnisses aus Abb. 4-2 zu 14,5 nm-Periode: 3 Schichten; box: Überschneidungsbereich mit dem Ergebnis:

b: Superpositionsmuster aus a.

c: zusätzliche antiparallele Versetzung von 12 nm (vgl. Abb. 4-2) zweier Muster aus b; box: Überschneidungsbereich zu:

d: 1,5 Perioden der Superposition aus c zum direkten Vergleich mit Abb. 3-25 D

B: Fragment 3-1 (89,5 nm)

C-N-Molekülüberlappungen (hell) verengen sich bei um 2 nm verkürztem C-Terminus entsprechend (vgl. Abb. 4-2 D)

a: Überlagerung zu 14,5 nm-Periode analog zu A

b: Superpositionsmuster aus a

c: zusätzliche antiparallele Versetzung von 10 nm zweier Muster aus b analog zu A

d: 1,5 Perioden der Superposition aus c zum direkten Vergleich mit Abb. 3-26 B

Dabei ist es wichtig festzuhalten, dass es sich bei diesen Versetzungen nicht notwendigerweise um 14,5 nm-Schritte handeln muss; jedes Vielfache des Köpfchenabstandes ungleich

3n wird zu diesem Ergebnis führen, solange sich die dritte Schicht analog zur zweiten verhält.

Das Superpositionsmodell in Abb. 4-3 A b kann noch nicht in allen Belangen überzeugen. Zwar stellt sich ein alternierendes Hell-Dunkel-Muster mit Grauübergängen ein, ein exakt entsprechendes Verhältnis von Dunkel/Hell-Zone war jedoch nicht beobachtet worden. Die entscheidende Korrektur hin zu dem in Abb. 3-25 D dargestellten Profil ergibt sich, wenn man das Ergebnis der ersten Überlagerung erneut um einen Betrag versetzt, der demjenigen entspricht, um den im 43,5 nm-Modell die polar angeordneten Anteile antiparallel gegeneinander verschoben sind, nämlich 12 nm (Differenz der Moleküllänge 91,5 nm und des antiparallelen *overlaps* von 79,5 nm, vgl. Abb. 4-2 C). Bis hin zu dem schmalen Faden innerhalb der hellen Zone entspricht damit das Ergebnis der Modellierung dem durch Filterung erhaltenen Dichteprofil eines 3-19 Parakristalls mit lateraler Ordnung: Abb. 4-3 A d.

Nun kann bei dieser Vorgehensweise der Eindruck entstehen, man arbeite mit ausgesprochenen Schichten definierter Zusammensetzung; es ist wichtig, noch einmal festzuhalten, dass diese Modelle nichts über die dreidimensionale Organisation, d.h. die relative Lage der Moleküle zueinander in der Tiefe aussagen. Schon oben ist darauf verwiesen worden, dass es lediglich eine Frage der Darstellung ist, welche der vielzähligen Interaktionen betont wird. So wird auch deutlich, dass die zuletzt eingeführte Versetzung keine grundsätzlich neuen Interaktionen hervorruft. Schon nach der ersten Kombination von 43,5 nm-Profilen (Abb. 4-3 B) sind potentiell alle antiparallelen Beziehungen möglich, die auch in dieser Endzusammensetzung zum Tragen kommen können. Ausgehend von der Darstellung einer N-N-Überlappung von 79,5 nm ergeben sich diese zu $79,5 \text{ nm} \pm n \cdot 14,5 \text{ nm}$. In anderer Form war dies oben schon diskutiert worden, als darauf verwiesen wurde, dass die hier als bevorzugt dargestellte antiparallele Interaktion sich lediglich um eine Versetzung von 14,5 nm vom Bennett-Modell unterscheidet. Letztlich liegt nun also eine Kombination von 6 Grundeinheiten vor.

Durch die Möglichkeit, ein spezifisches 14,5 nm-Muster durch Addition aus dem 43,5 nm-Modell für ein bestimmtes Fragment herzuleiten, hat dieses nun eine deutliche Bestätigung erfahren. Lässt man den Plausibilitäts-Aspekt im Vergleich zum Bennett-Modell einmal außen vor, so kann aus dieser Tatsache allein die von Bennett vorgeschlagene Polarität der Moleküle noch nicht abgeleitet werden. Diese lässt sich überprüfen, indem Fragmente mit Deletionen in gleicher Weise betrachtet werden. Für das Fragment 3-1 konnte auf Lipidmonolayern eine hochgeordnete Formation erhalten werden, die ein charakteristisches Profil über die 14,5 nm-Periode ausbildet: Im Unterschied zu den bisher für das längere 3-19-Fragment beschriebenen, eher sinusoiden Mustern wird hier der Hellbereich zusätzlich von Dunkelzonen eingerahmt (Abb. 3-26 B). Abb. 4-3 B zeigt, wie durch analoges Vorgehen zu den Operationen für das Fragment 3-19 exakt dieses Bandenmuster modelliert werden kann,

wenn man eine C-terminale Deletion von 2 nm, d.h. eine Moleküllänge von 89,5 nm zugrunde legt. Der über Rotationsbedampfung bestimmte durchschnittliche Unterschied C-terminal deletierter Fragmente zu den entsprechenden Exon19-Pendants beträgt 2,35 nm. Das 43,5 nm-Ausgangsmuster (Abb. 4-3 B a) unterscheidet sich dann aufgrund der geringeren Überlappung durch schmalere Hellzonen von dem in Abb. 4-3 A a dargestellten. Im letzten Schritt entspricht eine 10 nm-Versetzung der für das längere Fragment modellierten Muster-verschiebung von 12 nm (vgl. Abb. 4-2 C; N-terminaler *overlap* von 79,5 nm bleibt konstant). Diese Ergebnisse stützen auch die Überlegungen zur Polarität der Moleküle des Ursprungsmodells in Abb. 4-2 D.

In der beschriebenen Art und Weise wurde ein Modell entwickelt, das das Zustandekommen eines komplexen Bandenmusters durch die Kombination von 36 Molekülen erklärt. In der oben zur Veranschaulichung gewählten Stapeldarstellung von 6 Schichten läge – nimmt man einen Moleküldurchmesser von 2 nm an - eine seitliche Wiederholung im Abstand von ca. 12 nm vor. Zudem muss die Uranyl-Penetration eine Abbildung von Einzelheiten in ca. 12 nm Tiefe möglich machen. Mit einem Literaturwert von 6-10 nm Färbungstiefe für *negative staining*-Präparate (Klug & Berger, 1964) sind dies Werte im methodischen Grenzbereich. Jede Verzahnung von Einzelkomponenten im Sinne einer „knobs-into-hole“-Packung (Abb. 4-1 A) wird jedoch den Wert von 12 nm vermindern. Insbesondere eine Ausbildung von Superstrukturen und deren engste Packung kann ein Molekülschema wie das oben abgeleitete räumlich konzentrieren.

Dieses Modell wurde ebenfalls als Startpunkt zur Erklärung der Überlagerungsmuster kleinerer Fragmente herangezogen. Aus der Schichtanordnung von 2-18-Fragmenten wird ein meridionales 14,5 nm-Muster herausgefiltert (Abb. 3-26 A), das dem aus 3-1-Molekülen nahezu entspricht (Abb. 3-26 B). Verkürzt man die für das 3-1-Modell verwendeten Moleküle N-terminal um 29 nm – was der theoretischen Länge eines 195 Aasen langen Proteins in α -helikaler Konformation entspricht – so ergeben sich die in Abb. 4-4 A dargestellte Muster, deren analoge Überlagerung exakt denen in Abb. 4-3 B abgeleiteten entsprechen. Dass die Messwerte rotationsbedampfter Moleküle eine durchschnittliche Längendifferenz von 26,6 nm zwischen langen und kürzeren Fragmenten anzeigt, wurde an entsprechender Stelle schon diskutiert, und es besteht die Möglichkeit, dass sich die kleineren Moleküle in Lösung anders falten (s.a. Kap. 4.2.3).

Für die kleineren Expressionsprodukte hatte es allerdings keinen direkten Hinweis auf die Beteiligung von 43,5 nm versetzten Dimeren gegeben; entsprechende Perioden wurden nicht beobachtet. Auch andere, weiter unten zu diskutierende Befunde gaben Anlass, für diese Expressionsprodukte alternative Muster in Betracht zu ziehen. Abb. 4-4 B demonstriert, wie dasselbe Überlagerungsmuster auf der Basis eines Dimers aus 14,5 nm versetzten Molekülen, das sich im Abstand von 58 nm wiederholt, konstruiert werden kann.

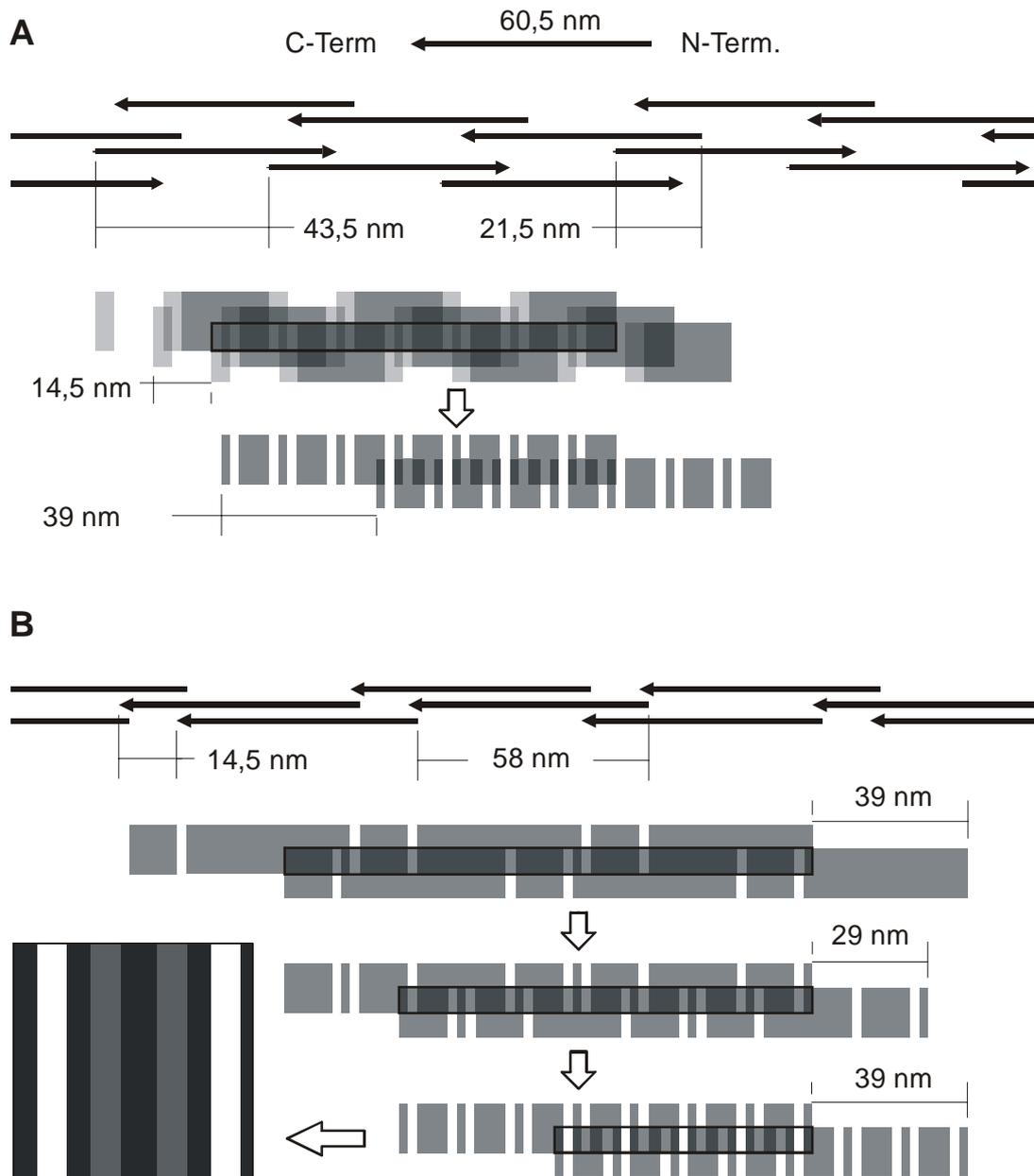


Abb. 4-4: 14,5 nm-Periode: Superpositionsmuster für das Fragment 2-18

A: Superposition des Molekülmodells analog zu Abb. 4-2:

Erste Ebene: 43,5 nm versetzte Moleküle bilden die erste Ebene der parallelen Versetzung; die antiparallele Überlappung ergibt sich im Vergleich zu N-terminal um 29 nm längeren Fragmenten zu $79,5 - 58 = 21,5$ nm (= Versetzung des Gesamtmusters um $60,5 - 21,5 = 39$ nm)

Superpositionen: analog zu Abb. 4-3: 14,5 nm Versetzungen + weitere antiparallele Komponente

B: Alternatives Molekülmodell:

Erste Ebene: Grundbaustein der parallelen Zusammenlagerung sind 14,5 nm versetzte Dimere, die sich alle 58 nm wiederholen; die erste antiparallele Komponente von 39 nm (s.A) ist separat als Überlagerung dargestellt.

Superpositionen: Die 14,5 nm-Periode entsteht durch Versetzung der ersten Ebene um 29 nm; das Ergebnis entspricht dem in A.

Die letzte antiparallele Versetzung ergibt für beide Molekülmodelle dasselbe Muster wie für das Fragment 3-1 (Abb. 4-3 B). Dargestellt sind 1,5 Perioden zum direkten Vergleich mit Abb. 3-26 A.

Damit ändert sich die Operation, durch die eine kontinuierliche Besetzung der 14,5 nm-Ebenen erreicht wird, zu einer 29 nm-Verschiebung. Gemeinsam und unabdingbar zur korrekten Darstellung des Gesamtergebnisses ist den beiden Modellen die oben hergeleitete antiparallele Komponente, die im Falle der kleineren Fragmente in einer Musterverschiebung um 39 nm resultiert. Anhand der Überlagerungsoperationen in Abb. 4-4 B ist nachzuvollziehen, dass dieses Modell das Ergebnis mit lediglich 32 Molekülen produzieren kann. Eine verwandte Herleitung mit gleicher Molekülzahl ist unter Verwendung von 29 nm versetzten Dimeren möglich. Eine solche parallele Interaktion ist zwar als Grundbaustein einer Zusammenlagerung von LMM nach den Untersuchungen zur Ladungskomplementierung von McLachlan und Karn nicht zu favorisieren (McLachlan & Karn, 1982), wird aber dennoch berücksichtigt werden (Kap. 4.4.2).

Andere Dimer-Versetzungen in Vielfachen von 14,5 nm schließen sich aufgrund der Moleküllänge aus. Es muss konstatiert werden, dass die parallelen Anteile einer komplexen bipolaren Anordnung weniger eindeutig zu bestimmen sind als deren antiparallele Komponenten. Das Modell in Abb. 4-4 B überzeugt vor allem durch seine Kompatibilität mit den von McLachlan und Karn abgeleiteten Grundversetzungen und durch die Tatsache, dass hier schon auf erster Ebene C-N-Molekülüberlappungen entstehen, die das Erscheinungsbild der Periode durch die entsprechenden 2 nm breiten Hellbereiche wesentlich prägen. Diese Überschneidungsbereiche bilden um 58 nm versetzte Molekülkombinationen, die – wie die 87 nm-Paare des Modells nach Bennett – vom McLachlan/Karn-Schema abweichen. Eine direkte räumliche Nachbarschaft solcher Moleküle sollte im 3-dimensionalen Aufbau ausgeschlossen sein. Dies scheint jedoch auf einfache Weise gewährleistet, da jedem dieser kurzen Abschnitte ein im Ladungsschema kompatibler Partner (ein entweder 14,5 oder 43,5 nm versetztes Molekül) zur Verfügung steht (vgl. Abb. 4-4 B).

Durch die geringere Anzahl beteiligter Moleküle vermindern sich die oben aufgeführten Beiträge für die Etablierung des Färbungsmusters entsprechend. Eine Zusammenlagerung einzelner Komponenten zu übergeordneten Strukturen – ein 3-D-Element wie ein Subfilament – würde weit darüber hinaus die für reine seitliche Anlagerung abgeleiteten Werte beträchtlich reduzieren. Anzeichen einer überlagernden Struktur konnten speziell im Falle eines der kürzeren Fragmente tatsächlich gefunden werden:

4.3.3 58 nm-Modulation

Verschiedene Aggregate des Fragmentes 2-19 zeigen eine Dichtemodulation mit einer Periode von ca. 58 nm, die stets eine prinzipielle Wiederholung von 14,5 nm überlagert. Abb. 3-27 demonstriert, wie sich diese auf der Grundlage einer fast reinen Grundperiode von 14,5 nm als zusätzliche Eigenschaft entwickelt. Dabei zeigt die Filterung auf die 14,5 nm-Periode deren Übereinstimmung mit den oben diskutierten Mustern.

Die sich sinusoid darstellende Färbungsvariation mit einer Periode von 58 nm konnte nur in einem Sonderfall einer extrem homogenen zylinderförmigen Aggregationsform (spezielle Aggregationsbedingungen) in weitestgehend konstanter Ausprägung beobachtet werden (Abb. 3-28). Dank der hohen Regelmäßigkeit dieses Objekts werden Ordnungen bis in den Bereich von 3 nm registriert, die die Identifizierung der Periode zu 58 nm möglich machen. Auch dort zeigt sich aber, dass es sich um eine eher labile Eigenschaft handelt: während die 14,5 nm-Grundperiode in kaum wiedergefundener Weise klar und exakt definiert ist (wie auch der Gesamtkörper des Aggregats), ist die überlagerte Modulation nicht nur vergleichsweise dünn, sondern bleibt auch nicht über die gesamte Länge des Parakristalls konstant im überwiegend schachbrettartigen Muster erhalten. Nun war das Zustandekommen der prinzipiellen Periode von 14,5 nm im vorangegangenen Abschnitt hinreichend erklärt worden, immer unter dem Hinweis, dass diese Modelle nicht dazu gedacht sind, den dreidimensionalen Aufbau zu berücksichtigen.

Es liegt daher nahe anzunehmen, dass die hier vorliegenden überlagernden Färbungsschwankungen mit der räumlichen Organisation der Moleküle in Zusammenhang stehen. Der schachbrettartige Hell-Dunkel-Wechsel der 58 nm-Eigenschaft, der in Abb. 3-28 F explizit visualisiert ist, schlägt sich in der FFT in der Anwesenheit von Beugungsintensitäten ausschließlich ungerader Ordnungen dieser Periode außerhalb des Meridians nieder. Ein gleitend alternierendes Hell-Dunkel-Profil in Verbindung mit dreidimensionaler Konformation lässt die Möglichkeit einer Windung von Substrukturen - der Ausbildung von gewundenen Molekül-Bündeln also - attraktiv erscheinen. Da die Auflösung der Struktur geringfügig unterhalb von 3 nm anzusiedeln ist, können reine *coiled coils*, sprich Einzelmoleküle, hier keine direkte Rolle spielen; abgesehen davon liegt die zur Diskussion stehende Periode fast um eine Größenordnung außerhalb möglicher *coiled coil*-Parameter. Auf nächst höherer Organisationsebene steht die Windung von Einzelmolekülen zu einer helikalen Strangstruktur. Schließlich ist in einem weiteren Schritt ein supercoiling von Strängen zu Subfilamenten möglich. Jedoch gibt der Zylinder keinen Aufschluss über seitliche Molekül- oder Substruktur-Abstände: der Äquator der FFT zeigt zwar in wenigen Fällen Reflexe, diese rühren dann aber von der lateralen Ausdehnung der fleckenartigen Musterung her. Es steht damit eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Auswahl, die zur Ausbildung einer solchen Dichtemodulation führen können, von denen beispielhaft zwei in Abb. 4-5 dargestellt sind. Dort lassen sich einige Färbungseigenschaften von gewundenen Superstrukturen nachvollziehen: Abb. 4-5 A zeigt, wie das Oberflächenprofil einer zweifach symmetrischen *coiled coil*-Struktur eine Periode von der Hälfte der Windungslänge ausbilden kann. Entsprechend liegt diese Größe bei dreifach symmetrischen Gebilden bei einem Drittel der Supercoil-Windung (Abb. 4-5 C). In der letzten Darstellung ist zusätzlich implementiert, dass die Händigkeit der Windung auf der Grundlage eines Hell-Dunkel-Wechsels alleine nicht hergeleitet werden kann.

Eine Rotation bei der seitlichen Anlagerung wird ebenfalls zu einer Veränderung des Färbungsprofils führen. Beispielsweise resultiert in der *coiled coil*-Formation eine sukzessive Drehung der nächsten Komponente um 90° in einer Halbierung der ursprünglichen Periode. Dieser Effekt kann aus der Darstellung in Abb. 4-5 B extrapoliert werden, die im Wesentlichen zeigt, wie ein Wechsel der Drehorientierung um 90° (einer „knobs-into-hole“-Beziehung an der betreffenden Stelle) in einer Muster-Verschiebung um $\frac{1}{4}$ der Periode resultiert. Eine solche Versetzung in regelmäßigen Abständen führt zur Ausprägung eines Schachbrett-Musters (vgl. Abb. 3-28 F).

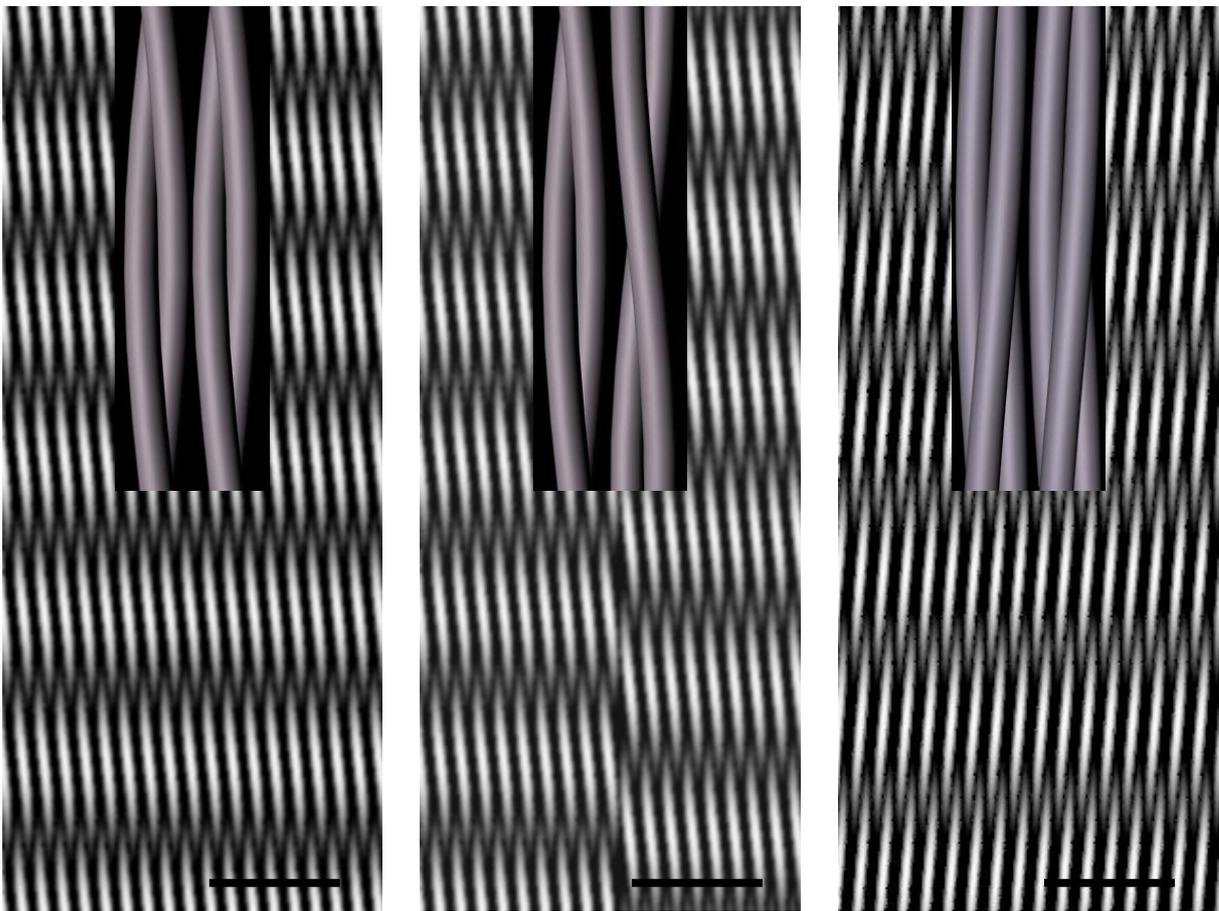


Abb. 4-5: 58 nm-periodische Oberflächenreliefs von Subfilament-Anordnungen

Simulation des *staining*-Verhaltens durch Darstellung der Z-Tiefe: erhabene Strukturen sind hell. Vertikale Ausdehnung: 348 nm; *inset*: Vergrößerung (58 nm) der zugrunde liegenden Subfilamentstrukturen (Strang-Durchmesser = 4nm; Balken = 50 nm)

- A:** Doppel-*coiled coils* mit *pitch* 116 nm; unversetzte Aneinanderlagerung von Subfilamenten aus zwei Strängen
- B:** wie A; mittig: Versetzung von $\frac{1}{4}$ *pitch* oder Drehung um 90° ; Versetzungsebene im *inset* vergrößert
- C:** Dreifach-*coiled coils* mit *pitch* 174 nm; unversetzte Aneinanderlagerung von Subfilamenten aus drei Strängen

Wenn eine solche Formation in Bereichen gestörter Ordnung einen Abweichungsbetrag bei der Drehung aufweist, so kommt es zu einem Färbungsdrift, d.h. die Dichtemodulation verläuft nicht mehr senkrecht zur Längsachse der Gesamtstruktur.

Schließlich ist vorstellbar, dass hier zwei Komponenten im Sinne einer Moire-Überlagerung beteiligt sind: Eine der beiden verursacht eine Streifung in bestimmtem Winkel zur Achse des Parakristalls, eine darunter liegende verläuft fast exakt in Gegenrichtung. Betrachtet man Abb. 3-28 A unter diesem Gesichtspunkt, so lassen sich die beiden gegensätzlich orientierten Streifungen leicht ausmachen. Diese Art der Superposition gegensätzlich orientierter Muster würde man zum Beispiel von perfekt helikalen Strukturen geringer Objektiefe erwarten. Allerdings muss dann die Färbungstechnik in der Lage sein, Informationen von der Vorder- und Rückseite des Objekts abzubilden. Da der nadelförmige Kristall sich durch beträchtliche Tiefe auszeichnet, wie man am Verhalten des Uranylacetats an dessen Rändern beurteilen kann, ist auszuschließen, dass es sich bei der zweiten Komponente um die Rückseite des Kristalls handelt. Vielmehr bietet sich eine zweite Lage von Molekülen bzw. Strängen unterhalb der Oberflächenschicht an. Dabei könnte es sich auch um die Rückseite einer entsprechend dünnen Substruktur handeln.

Die entsprechenden Substrukturen müssten aber nach dieser Interpretation einer Moire-Überlagerung im sehr spitzen Winkel von ca. 10° zum Querschnitt des Zylinders verlaufen. Es ist schwer nachzuvollziehen, wie dann gleichzeitig eine 14,5 nm-Periode in Längsrichtung koexistieren kann. Die Molekülmodelle setzen einen mindestens tendenziell achsenparallelen Verlauf von Einzelmolekülen voraus und können so die Muster der Köpfchenperiode in Bereichen flächiger Ordnung hinreichend erklären (s. Kap. 4.3.2). Ein Moire-Muster kann daher als unwahrscheinlich angesehen werden.

Das Tubus-artige Erscheinungsbild des Zylinders scheint eine flächige Grundanordnung *a priori* auszuschließen, so dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bei der in Abb. 3-28 D dargestellten Filterung auf die 14,5 nm-Periode um ein Hybridmuster aus unterschiedlichen Ansichten handeln dürfte, das ohne Kenntnis der 3-dimensionalen Struktur nicht eindeutig zu modellieren ist. Zudem zeigt der Ausschluss der Ordnungen dieser Periode in Abb. 3-28 E, dass bestimmte Feindetails der Färbung nicht direkt mit der 14,5 nm Wiederholung in Zusammenhang stehen. Eine positive Färbung von Ladungsmustern ist nicht auszuschließen. Wie immer sich dieses Feindetail herleitet, der Anteil des räumlichen Aufbaus scheint evident.

Zur weiteren Analyse dieser Strukturen bedarf es notwendigerweise Informationen zum dreidimensionalen Aufbau, die aus dem vorliegenden Material noch nicht zu erhalten sind. Kippserien eines derartigen Parakristalls könnten solche Informationen liefern. Es ist jedoch offensichtlich, dass ein oder mehrere zusätzliche, geordnete Organisationsebenen die räumli-

che Orientierung von Einzelmolekülen derart verändern kann, dass einfache Flächenmodelle nicht mehr alle Färbungseigenschaften hinreichend erklären können.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass in diesem Parakristall erstmals ein direkter Hinweis auf Superstrukturen vorliegt. Die Möglichkeiten sind jedoch zu vielfältig, als dass man allein auf der Grundlage der in Abb. 3-28 dargestellten Struktur definitive Vorhersagen zu deren Aufbau treffen könnte. Der wohl interessanteste Aspekt ist die Tatsache, dass die 58 nm-Periode in enger Verwandtschaft zur übergeordneten Periode in Insektenfilamenten von 116 nm steht. Bei einem zweifach-symmetrischen Aufbau von Super-Strukturen würde diese 58 nm-Modulation eine Windungswiederholung von 116 nm nahe legen (Abb. 4-5 A/B). Damit scheint nicht ausgeschlossen, dass eine Windung von Substrukturen an der Ausbildung dieser spezifischen Wiederholung mit beteiligt ist.

4.3.4 116 nm-Periode

Diese Periode des Insektenfilaments konnte direkt in Parakristallen beobachtet werden. Wie die im vorangegangenen Kapitel erörterten Gebilde, so werden auch 116 nm-periodische Parakristalle (Abb. 3-30) ausschließlich mit dem Fragment 2-19 (und der Mutante) erhalten. Sie kommen unter denselben ionischen Bedingungen zustande wie die Zylinder mit einer Dichteveriation von 58 nm. Auch der in Abb. 3-24 A gezeigte Parakristall mit 14,5 nm-Charakteristik ist ein Sonderfall innerhalb einer Präparation, die fast ausschließlich aus 116 nm-periodischen Strukturen besteht. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die unterschiedlichen Formationen miteinander verwandt sind und möglicherweise die schon beschriebenen Teilaspekte beinhalten, die unter besonderen Umständen zur Ausbildung des hier zu diskutierenden komplexen Musters beitragen.

In diesen Strukturen liegt im Unterschied zu den bis hierher vorgestellten nämlich erstmalig ein unipolares Muster vor: Die Moleküle sind also innerhalb der 116 nm-Formation wie in jeder A-Band-Hälfte des Filaments mit hoher Sicherheit parallel angeordnet. Zwar sind in Einzelfällen innerhalb eines Parakristalls (Abb. 3-30 A) Spiegelebenen zu beobachten, doch besitzt das Muster selber keine derartige Symmetrie (s. Abb. 3-30 B). In den Bereichen der Spiegelebene kehrt sich die Polarität der flankierenden Molekülanordnungen durch antiparallele Komponenten um, wie dies im Bereich der *bare zone* der Filamente der Fall ist.

Allein die oberflächliche Betrachtung der Parakristalle in Abb. 3-30 macht allerdings schon deutlich, wie komplex die beteiligten Komponenten organisiert sein müssen: Perioden sind mit dem bloßen Auge kaum auszumachen. Erst das Fourier-Transformat gibt einen Einblick in die Regelmäßigkeit der Struktur. Und hier wird direkt offensichtlich, wie außergewöhnlich diese Anordnung ist: Sie zeigt alle Komponenten des Beugungsbildes nativer Filamente. Ganz analog zum Transformate eines nativen Filaments (Abb. 1-3 A: *Lethocerus*-Filament) sind hier neben meridionalen auch off-meridionale Anteile in Form von Beugungslinien mit

lokalen Intensitätsmaxima auf korrespondierenden Netzebenen („layer lines“) zu beobachten. Nach vorliegendem Erkenntnisstand ist noch kein Parakristall oder gar Kristall beschrieben, dessen Beugungseigenschaften in dieser Weise mit dem des nativen Filaments verwandt ist. Im Gegensatz zu herkömmlichen Superpositionsmustern mit eindimensionalem Beugungsbild, wie sie oben diskutiert wurden, fließen in die nicht-meridionalen Beugungslinien Informationen der 3-dimensionalen Struktur mit ein. Mit diesen oder ähnlichen Objekten eröffnet sich also die einmalige Möglichkeit, Molekulanordnungen zu studieren, die für die Organisation von *coiled coils* im Filamentschaft von Bedeutung sein sollten.

Dieser hohe Informationsgehalt gerät allerdings insofern zum Nachteil, als in diesem Fall keine 2-dimensionalen Moleküldarstellungen mehr ausreichen, die Beobachtungen zu modellieren. Auch eine Filterung, die alle nicht meridionalen Anteile mit einschließt, ist aus verschiedenen Gründen nicht möglich. Vorerst mag der Hinweis genügen, dass die Lage der Maxima entlang der Beugungslinien – nicht jedoch die *layer line*-Komposition – mit dem betrachteten Bildausschnitt variiert, d.h. sie liegen nicht auf einem definierten Gitter und entziehen sich damit der Filterung.

Die Gesamtstruktur zeichnet sich durch ein für das bloße Auge unübersichtliches System von helleren Knötchen aus, die in ihrer lokalen Kombination die Streifung des Parakristalls ausmachen. Auch hier wird offensichtlich, dass das Erscheinungsbild dieser Art von Parakristallen durch deutlich mehr als lediglich die Molekülversetzungen bestimmt wird. Eine Systematik hinter dem zunächst verworren erscheinenden Muster lässt sich nur aus der FFT (Abb. 3-30 D) ableiten. Erst hier wird durch die Anwesenheit von 14,5 nm-Ordnungen auf dem Meridian deutlich, dass der Köpfchenabstand einen besonderen Teil der Anordnung repräsentiert. Diese meridionalen Anteile sind durch ihre symmetrische Verteilung um den Meridian von den übrigen Ordnungen von 116 nm verschieden. Letztere (i.E. die 3., 5., 11., 13., 19., 21., 27.) äußern sich als horizontal verlaufende Intensitätsprofile, deren Maxima alternierend rechts und links des Meridians zu liegen kommen. Diese Aufteilung von Intensitäten auf dem Meridian (Ordnungen von 14,5 nm) und dies- und jenseits findet sich in gleicher Weise im nativen Filament. Das Auftreten von Intensitätslinien anstelle von Punkten ist charakteristisch für helikal geordnete Objekte. Die Grundlagen der Theorie der helikalen Beugung, d.h. der Beugungseigenschaften kristalliner Anordnungen, deren Einheiten um ein Zentrum rotierend positioniert sind, gehen zurück bis 1952 und sind eng mit dem Namen Crick – bekannter geworden durch Anwendung dieser Prinzipien auf andere Objekte – verbunden (Cochran *et al.*, 1952).

Die beschriebenen, charakteristischen Intensitätsverteilungen wurden in so unterschiedlich dimensionierten Parakristallen wie jenen in Abb. 3-30 A und B gleichermaßen gefunden. Auch von Regionen, in denen sich der Parakristall verjüngt, werden ähnliche Transformate erhalten. Die seitliche Ausdehnung – die zylindrische Komponente als zentraler Bestandteil

einer kristallin-helikalen Ordnung – des Gesamtobjekts hat also keinen Einfluss auf die beobachtbaren Ordnungen. Das deutet darauf hin, dass nicht der Parakristall als Ganzes das zylindrische Objekt darstellt, sondern dass die helikale Ordnung auf einem niedrigeren Level angesiedelt ist.

Es liegt also die Vermutung nahe, dass es sich um eine Komposition handelt, in der einzelne helikal geordnete Objekte sich durch seitliche Assoziation zusammenlagern. Naturgemäß ist die laterale Organisation in Parakristallen, noch dazu in so polyformen, sehr selten derart regelmäßig, dass sie sich im Transformat niederschlägt. Die Ansicht in Abb. 3-30 E bildet vermutlich deshalb einen Sonderfall, da der Parakristall augenscheinlich in der Mitte abgeflacht ist. Die Ansammlung von Kontrastmittel im zentralen Bereich zeigt neben dieser Platteaubildung auch die beträchtliche Dicke der Struktur durch die Ausdehnung der flankierenden schwach gefärbten Zonen. Inwieweit dies Ausdruck einer Tendenz zur Bildung eines polygonalen Querschnitts (Bennett, 1981) ist, können nur entsprechende Schnittpräparate zeigen. Das globale Färbungsverhalten würde dem eines Hexagons nahe kommen. In entsprechend günstiger Orientierung und Auflösung ist ein Beugungspunkt in der Fläche der FFT auszumachen, der laterale Ordnung im Abstand von 11,2 nm senkrecht zur Parakristallachse anzeigt.

Damit liegt ein Fall vor, der bei der Diskussion der Kristalle eben dieses Fragments 2-19 in *E.coli* als nächste Stufe der Organisationsanalyse postuliert worden war: eine Anordnung, die einen Lateralabstand von 11,2 nm mit einer Längsperiode von 14,5 nm oder Vielfachem verbindet. Dort (Kap. 4.1.1) war dargelegt worden, dass die physiologische Relevanz eines 11,2 nm-Abstandes erst dann angenommen werden kann, wenn dieser gleichzeitig mit dem prinzipiellen Köpfchenabstand vorliegt. Hier koinzidiert er darüber hinaus mit der axialen Periode des Insektenfilaments und die Beugungscharakteristiken in Längsrichtung sind weitestgehend verwandt!

Der seitliche Abstand von 11,2 nm war an entsprechender Stelle schon vorläufig in Abwandlung des *coiled coil*-Modells nach Longley im Sinne einer engsten Packung von Doppel-Helices mit 4 nm dicken Unterelementen interpretiert worden. Dort wurden mit Hilfe des korrespondierenden Beugungsreflexes Längselemente rekonstruiert, deren interne Auflösung jedoch relativ schwach war. Der *pitch* solcher Supercoils konnte aber vor allem deshalb nicht abgeleitet werden, weil aufgrund des Fehlens einer 14,5 nm verwandten Periode die Orientierung des Schnittes entlang der exakten Längsachse der Unterelemente zweifelhaft war. Bei den Parakristallen der 2-19-Fragmente ist eine Ausrichtung der Struktur naturgemäß vorgegeben und eine 11,2 nm-Reflexion tritt in Verbindung mit einer Periode von 116 nm auf. Eine zufällige Übereinstimmung ist an sich schon reichlich unwahrscheinlich. Trotzdem waren aufgrund der schwachen Ausprägung des Beugungspunktes Zweifel an dessen Echtheit

angebracht. Die Beteiligung dieses Abstandes am 116-Gitter kann jedoch auf einfache Art demonstriert werden:

Dieser Punkt wurde zusammen mit den höheren Ordnungen von 14,5 nm (Abb. 3-30 F) zu einer 14,5 nm-periodischen Rekonstruktion benutzt, die in erster Linie dazu geeignet ist, die Validität dieser schwachen Reflexion zu demonstrieren. Diese Rekonstruktion kann nur ganz ausgewählte Anteile der Struktur erfassen, da die meridionalen Intensitäten nur einen Ausschnitt der Ordnungen von 116 nm einschließen. Die übrigen sind in ihrem Abstand zum Meridian zu wenig definiert, um sie verwerten zu können. Tatsächlich bleibt in der Rekonstruktion vom gesamten Muster lediglich ein durch die Eckpunkte der entsprechenden Einheitszelle gebildetes Gitter (Abb. 3-30 G). Diese Einheitszelle kann nun graphisch oder rechnerisch in der Fläche infinit wiederholt werden: es stellt sich in der Tat im rechten Winkel zur 11,2 nm-Kante, also längs zur Parakristall-Achse eine Wiederholung nach $8 * 14,5 = 116$ nm ein. Damit ist dieser Beugungspunkt als ein Teil der 116 nm Anordnung identifiziert und es wird offenkundig, dass diese Aspekte, nämlich der seitliche Abstand von Längselementen und die Periode des Insektenfilaments, senkrecht zueinander orientiert sind. Die entsprechende Strukturkomponente, das Supercoil in der Interpretation nach Longley, müsste damit parallel zur Achse des Parakristalls orientiert sein. Die Operation zur flächigen Wiederholung der kleinen Einheitszelle bringt gleichermaßen einen übergeordneten Parameter der lateralen Ordnung hervor: Das aufgespannte Gitter weist bei einer axialen Länge von 116 nm einen seitliche Kantenlänge von 33,6 nm, also dem Dreifachen des ursprünglich konstruierten Abstandes senkrecht zur Parakristall-Achse (d.h. $\gamma=90^\circ$) auf. Anhand von Abb. 4-1 B kann nun nachvollzogen werden, dass die dreifache Kantenlänge b der Anordnung nach Longley eine Anzahl von 6 Dimeren einschließt. Mit der Interpretation des Monomers als 4 nm dickes Subfilament umfasst die übergeordnete, 116 nm-periodische Einheitszelle also 12 Subfilamente, exakt die Anzahl von Untereinheiten des Insektenfilaments. Diese Beobachtungen rechtfertigen die Annahme, dass man über diese Strukturen Erkenntnisse über die 3-dimensionale Organisation des LMM im Insektenfilament gewinnen kann.

Neben der planaren Komponente, die durch den 11,2 nm-Punkt eine flächige Ordnung von Unterelementen anzeigt, sind Teile der Beugung eindeutig durch Phänomene helikalen Verhaltens gekennzeichnet: die nicht-meridionalen Ordnungen verhalten sich in ihrer Lage relativ zum Meridian und ihrer *layer line*-Zusammensetzung wie die durch die Köpfchenhelices auf Insektenfilamenten hervorgerufenen Beugungen. Auch dieser Umstand stützt die Annahme einer Beteiligung gewundener Strukturen. Ein Molekülmodell zum Aufbau dieser Parakristalle sollte demnach auf der Grundlage einer Anordnung von regelmäßig gewundenen Subfilamenten mit 4 nm Durchmesser nach Longley abzuleiten sein (vgl. Abb. 4-1 B). Bevor nun die beiden Beobachtungen in einer gemeinsamen Modellvorstellung kombiniert werden können, sollen einige theoretische Grundlagen der helikalen Beugung ausgeführt werden.

4.3.5 Helikale Beugung

Helices kann man sich als in einen Zylinder gerolltes, planares Gitter vorstellen, wie dies Abb. 4-6 A/B veranschaulicht. Hier ist eine Helix dargestellt, bei der 8 Elemente gleichmäßig auf 3 Windungen verteilt sind. Im gewählten Beispiel sollen die Elemente einen Abstand a von 14,5 nm haben, die Sinuswelle sich also nach $8 * 14,5 = 116$ nm wiederholen. Dieser axiale Abstand, in dem sich eine komplette Windung vollzieht (Periode der Sinusfunktion), wird wiederum als *pitch* p bezeichnet. Die Darstellung in Abb. 4-6 A demonstriert auch, dass das Transformformat einer helikalen Anordnung komplizierter sein muss, als das eines planaren Gitters, da verschiedene Ansichten der beugenden Elemente in der Tiefe erfasst werden.

Auf der anderen Seite bietet gerade dieser Umstand einen besonderen Vorteil solcher Gebilde: Kennt man die exakte Symmetrie (und damit die unterschiedlichen Orientierungen der Komponenten), so kann im Idealfall aus einer einzigen Ansicht die Struktur des Einzelelements rekonstruiert werden (Stewart, 1988). Die Tatsache, dass im einfachsten Fall einzelne planare Wellen hier noch einmal durch den Umlauf um einen Zylinder deformiert werden, äußert sich im Transformformat durch eine Elongation von Beugungsintensitäten – Linien entstehen anstelle von Punkten. Eine regelmäßige Unterteilung einer wellenförmigen Struktur durch gleichartige Untereinheiten verändert das kreuzförmige Beugungsbild einer ununterbrochenen Helix (nicht dargestellt) - also einer in Aufsicht sinusförmigen Welle - hin zu dem einer diskontinuierlichen Helix wie in Abb. 4-6 B. Diese Beugung ist mathematisch eine Konvolution (Verschraubung) zweier Typen von Transformaten (Lipson & Lipson, 1969): dem einer sinusoiden Spirale und dem einer planaren „sampling“-Funktion. Die Diskontinuität wird im gegebenen Fall durch die Einzelmoleküle und deren Überlappungen verursacht.

Abb. 4-6 A zeigt eine solche diskontinuierliche Helix mit beugenden Elementen in regelmäßigen Abständen a . Die Darstellung als Helix-Netz in 4-6 B beinhaltet ein vereinfachtes Transformformat der Helix in A (nach Morris *et al.*, 1991), die einige weitere Eigenschaften demonstriert:

- Alle Netzebenenabstände sind Ordnungen der Helixwiederholung (hier: 116 nm).
- Meridionale Beugungs-Maxima tauchen auf Ordnungen des reziproken Abstands $1/a$ auf (a = axialer Elementabstand; hier: 8.Ordnung von 116 nm = 14,5 nm).
- Bei nicht-kontinuierlichen Helices entstehen Intensitäten nur auf bestimmten Ordnungslinien (hier: 3., 5., 8., und 11. Ordnung).
- Die Maxima der nicht-meridionalen Intensitäten verteilen sich bei planarer Ansicht wie im Helix-Netz oder bei Aufsicht auf die Vorderseite eines Zylinders alternierend um den Meridian. In Fällen, in denen in gleicher Gewichtung auch die Rückseite des Zylinders sichtbar ist, würden die Beugungsintensitäten symmetrisch beiderseits des Meridians erscheinen, da die Rückseite eines Tubus aus der vorgegebenen Perspektive ein Spiegelbild darstellt.

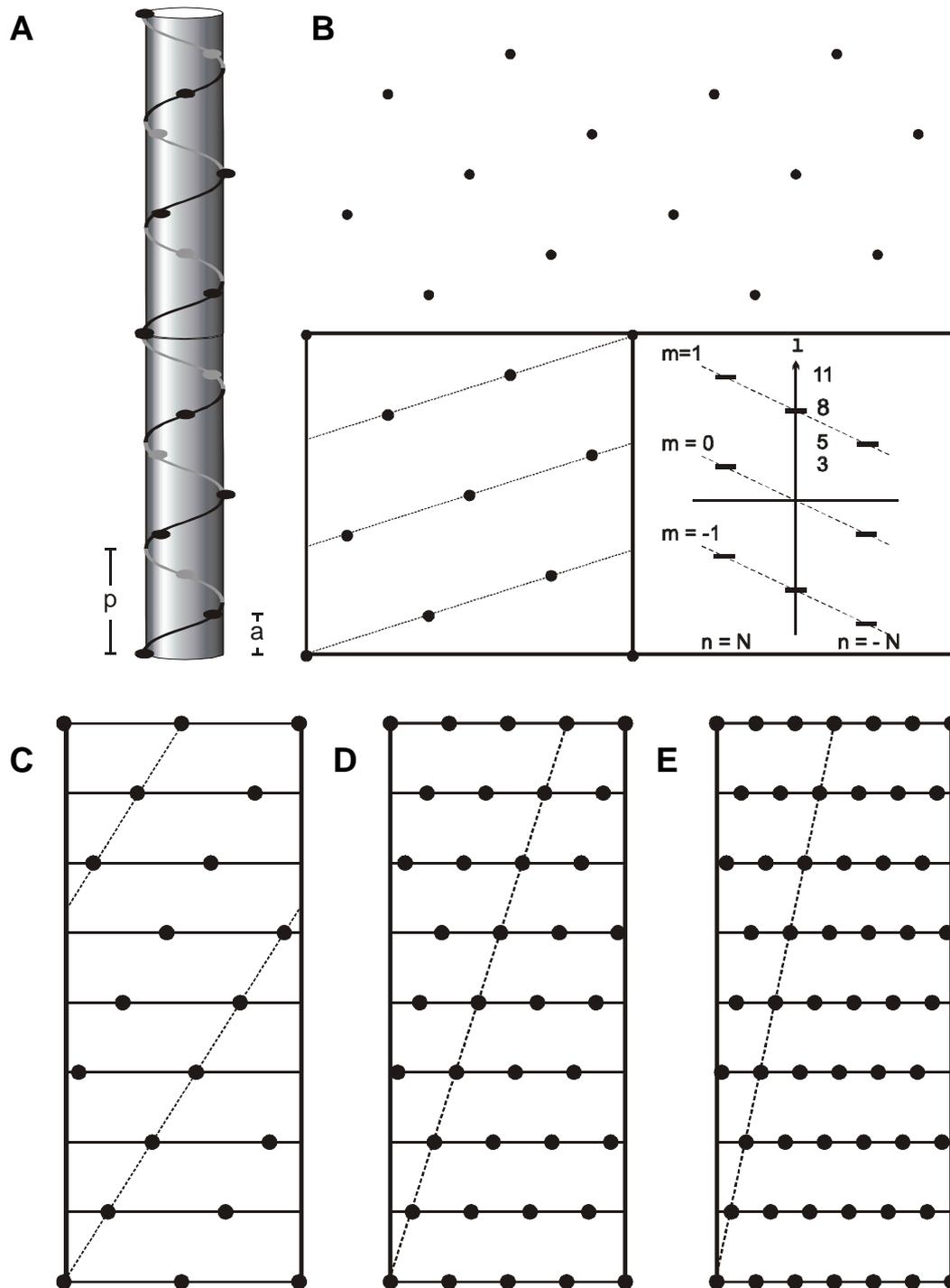


Abb. 4-6: Diskontinuierliche Helices

A: Diskontinuierliche Helix mit 8 Elementen im Abstand $a = 14,5 \text{ nm}$ pro 3 Windungen (rechtshändig; $2 \times 116 \text{ nm}$)

B: Flächige Projektion der Helix in A (Grundhelix im linken Kasten gerahmt) mit schematisiertem Beugungsdiagramm im rechten Kasten: meridionale Maxima: Ordnungen des Elementabstands $a = 14,5 \text{ nm}$ (8. Ordnung); innere Maxima, für die gilt: $n = \pm N$ (d.h. $q = 1$; $N = \text{Rotationssymmetrie}$). Maxima für verschiedene m -Werte verbunden. Prinzipiell gleiche Verteilung der Maxima ergeben:

C: $N=2$: zweisträngige Köpfchen-Helix nach Reedy (rechtshändig !) auf *Lethocerus*-Filamenten

D: $N=4$: viersträngige Köpfchen-Helix (*Lethocerus*) nach Wray

E: $N=6$: sechssträngiges Köpfchen-Modell für Insektenfilamente nach Squire

In einer beliebigen helikal-kristallinen Anordnung muss sich die Helixwelle im Umfang des Zylinders in ganzzahliger Rotationsfrequenz N wiederholen ($N=1$ für die Helix in Abb. 4-6 A). Die auftretenden Ordnungen/*layer lines* (l) einer helikalen Struktur beschreibt die sogenannte „selection rule“ (Cochran *et al.*, 1952; Klug *et al.*, 1958). Für eine Basishelix (alle Punkte des Netzes sind erfasst) mit u Elementen („units“) pro t Windungen („turns“) gilt:

$$l = u * m + t * n \quad \text{mit:}$$

m ganzzahlig: positiv, negativ oder 0 und:

$$n = \pm q * N \quad (\text{ganzzahlig}) \quad \text{mit}$$

N = Anzahl paralleler Helices im Umfang des Zylinders (=Rotationssymmetrie) und q = ganzzahlig

In der Praxis sind bei der Betrachtung biologischer Objekte mit einem gewissen Grad an Unordnung neben den meridionalen Intensitäten vor allem die dem Meridian am nächsten liegenden Intensitäten (für diese gilt: $q = \pm 1$ (damit $n = \pm N$)) von Bedeutung, auf die sich auch die Abb. 4-6 B beschränkt. Die Intensitäten auf den weiter vom Meridian entfernt liegen Maxima fallen meist sehr schwach aus.

Für diese innersten Maxima der in Abb. 4-6 A dargestellten Helix gilt: $l = 8m \pm 3$, also 8 *units* in 3 *turns* ($N=1$ und $q=1$). Dies ist eben die Beziehung, wie sie sich für die Intensitäts-Verteilung des Insektenfilaments und der FFT des Parakristalls ergibt: in wechselnder Lage zum Meridian mit Ordnungen von 14,5 nm ($n = 0$, also $l = 8m$) entstehen Intensitäten auf der 3. ($m = 0$, also $l = \pm 3$), 5., 11. ($m = 1$, also $l = 8 \pm 3$), und analog in der Folge der 13., 19. ($m = 2$, also $l = 16 \pm 3$), 21. und 27. Ordnung ($m = 3$, also $l = 24 \pm 3$).

In der schematischen Darstellung kann das vorgestellte Beugungsdiagramm noch eine Familie weiterer Helices zur Grundlage haben: Das Vorhandensein multipler Parallelhelices (höhere Rotationssymmetrie N) wird sich nämlich dann nicht auf die entstehenden Ordnungslinien auswirken, wenn deren *pitch* sich analog verhält. Die Abbildungen. 4-6 C-E zeigen zu B alternative Anordnungen, die dieselben *layer line*-Charakteristiken mitbringen. Nicht zufällig handelt es sich hierbei um Darstellungen möglicher Helices von Köpfchen entlang des Myosinfilaments von Insektenmuskeln nach I) Reedy, II) Wray und III) Squire, in denen jeweils eine 116 nm Periode dargestellt ist (zum Abgleich mit der schematischen FFT ist die von Reedy beobachtete Symmetrie spiegelbildlich dargestellt). Im anschließenden Teil der Diskussion wird versucht werden, aus der Struktur der Parakristalle, insbesondere der 116 nm-periodischen, ein Modell der *backbone*-Organisation in Insektenfilamenten herzuleiten. Setzt man in Abb. 4-6 A die Wiederholung der einfachen Helix ebenfalls zu 116 nm, so ergibt sich dort ein *pitch* von $\frac{1}{3} = 38,66$ nm, in der zweisträngigen Anordnung nach Reedy einer von 77,33 nm u.s.w. (s. gestrichelte Helix-Pfade). Dabei bleibt der axiale Abstand einzelner Helices konstant bei 38,66 nm.

Anders ausgedrückt: Man findet die 8 *units* beispielsweise im Wray-Modell in $\frac{3}{4}$ *turns* wieder, was bei $N=4$ ($t \cdot n = \frac{3}{4} \cdot 4 = 3$) wiederum zur *layer line*-Komposition $8m \pm 3$ führt. Diese Helix wird dann ganzzahlig als 32/3-Helix bezeichnet. Fixpunkt aller dieser Anordnungen ist die Helixwiederholung bei 116 nm, der übergeordneten Periode.

Es mag an dieser Stelle verwundern, dass es so unterschiedliche Vorstellungen zur Anordnung der Köpfcchen gibt oder zumindest lange Zeit gegeben hat. Tatsächlich gibt es Gesetzmäßigkeiten für die Intensitäten im helikalen Beugungsbild, die grundsätzlich die Ableitung der Strangzahl erlauben: Die Intensitäten entlang einer *layer line* folgen den sogenannten Besselfunktionen, Wellenfunktionen mit definierten Intensitätsmaxima im Abstand vom Meridian. Insbesondere die Position der dem Meridian am nächsten liegenden Maxima wird entscheidend durch die Anzahl der Helices bestimmt. Gleichzeitig besteht eine eindeutige Beziehung zum Realabstand des beugenden Details von der Helixachse.

Kennt man den Realradius des Massezentrums des beugenden Elements, so kann man die Strangzahl einer regelmäßigen Helix zweifelsfrei bestimmen. Da dieses Massezentrum jedoch insbesondere bei der Untersuchung von Gesamtmuskel-Proben schwer zu bestimmen ist (abhängig von Orientierung der Köpfcchen, Anheftungsgrad), konnten lange Zeit mehrere Theorien nebeneinander bestehen.

Welche direkten Rückschlüsse also lassen diese Grundlagen auf die Struktur des 116 nm-Parakristalls zu?

1. Die Achse der helikal beugenden Elemente ist parallel zur Längsachse des Parakristalls orientiert (alternierende Verteilung der off-meridionalen Anteile).
2. Die beugenden Elemente (oder äquivalente Teile davon) liegen auf einem Liniensystem mit der Periode 14,5 nm: Ordnungen auf dem Meridian.
3. Das Verhältnis $p/N = c$ (Helixabstand) beträgt 38,7, da die Ordnungen der inneren Maxima wie im intakten Muskel der Gleichung $l = 8m \pm 3$ folgen.

Nun waren oben die planaren Komponenten der Anordnung schon hervorgehoben worden. Grundsätzlich könnte also der gesamte Parakristall beugen wie ein regulär zweidimensionales Kristallgitter. Das wirft die Frage auf, warum einige Anteile sich abweichend verhalten. Harburn *et al.* stellen in ihrem Atlas Optischer Transformate mit Lochmasken unter anderem auch das Beugungsverhalten diskontinuierlicher Helices nach (s. z.B. Galerie 21 in (Harburn *et al.*, 1975)). Tatsächlich resultiert eine planare Anordnung von Elementen, die ihrerseits eine interne helikale Symmetrie aufweisen, im Transformate wieder in einer Fokussierung der Beugungspunkte, der Elongationseffekt verschwindet und alle Ordnungen sind auch wieder auf dem Meridian vertreten. Wesentliche Aussagen der dort simulierten Effekte lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- a) Während der Abstand der länglichen off-meridionalen Maxima von der Ordinate bei Beugung einer der Einzelhelix durch den Abstand der Elemente von der Helixachse

bestimmt wird, werden die Horizontalabstände der FFT einer planaren Wiederholung derselben Helix durch den seitlichen Abstand der einzelnen Helices bestimmt. Die Information über die Zusammensetzung und Symmetrie der Einzelhelix liegt dann in der Intensität an diesen Punkten; durch diese Rasterung („sampling“) verschwindet die Elongation von Intensitätsmaxima entlang einer Ordnungslinie; diese ist auch auf dem Meridian vertreten.

- b) Die layer-line Komposition und die alternierende Verteilung von Intensitäten beiderseits des Meridians ändert sich unabhängig von der Art der Kombination einzelner diskontinuierlicher Helices nicht, sie wird nur durch die Anordnung der Einzelelemente in der Ursprungsformation bestimmt.
- c) Gestörte Ordnung in der Fläche durch Versetzungen in vertikaler wie in horizontaler Richtung nähert das resultierende Transformate dem der Ursprungs-Helix an; es entstehen Hybrid-Beugungsbilder, in denen die Intensitäten auf einer Ordnungslinie zwischen dem Meridian und dem ersten Maximum der Einzelhelix verschmieren.

Die linienartige Verbreiterung der off-meridionalen Maxima zeigt also, dass Abweichungen vom regulär geordneten, planaren Zustand (einfache Seit-an-Seit-Assoziation von helikalen Mustern, Intensitäten aller Ordnungen auf dem Meridian) vorliegt. Diese Abweichungen könnten beispielsweise die unter c) aufgeführten Effekte darstellen, da es sich nicht um einen perfekten Kristall handelt. Die Anwesenheit eines Beugungspunktes in der Fläche der FFT, der eine seitliche Regelmäßigkeit im Abstand von 11,2 nm anzeigt, bedeutet dann, dass das Objekt hauptsächlich in vertikaler Richtung ungeordnet ist.

Punkt b) der oben aufgeführten Beobachtungen nach Harburn *et al.* zeigt schließlich, dass wie auch immer geartete Inhomogenitäten in der seitlichen Assoziation einzelner Helices die charakteristische, alternierende Verteilung von Intensitäten relativ zum Meridian nicht beeinflussen. Die entstehenden Ordnungen sind aber sehr schnell dann modifiziert, wenn sich die Grundsymmetrie des Einzelelements verändert. Dazu vergegenwärtige man sich noch einmal die gegenseitige Abhängigkeit von *pitch* p , Strangzahl N und axialer Wiederholung.

Die Symmetrieverhältnisse innerhalb der helikalen Grundanordnung stellen die eigentliche Determinante der *layer line*-Komposition im Sinne der *selection rule* dar. Sie bleiben im Parakristall der Abb. 3-30 trotz offenkundiger Unordnung hauptsächlich in der vertikalen Assoziation von in sich definiert geordneten Grundelementen exakt wie im isolierten Filament erhalten.

Im vorliegenden Fall kann dies zusammenfassend bedeuten, dass man es hier mit einer Kombination von Gebilden zu tun hat, die in ähnlicher Organisationsform auch im *backbone* der Filamente vorliegen. In diesem Sinne soll im Folgenden ein Molekülmodell erarbeitet und dessen Übertragbarkeit auf das Insektenfilament überprüft werden.

4.4 Modell zur Molekülanordnung mit einer Periode von 116 nm

Wie kann eine Zusammenlagerung von Stäben in Parakristallen sich überhaupt in der Beugung ähnlich wie ein Filament verhalten? Die beugenden Strukturen bei der Untersuchung von intakten Filamenten stellen zum überwiegenden Teil die voluminösen Köpfchen dar. Im vorliegenden Fall sind diese gleichsam durch Molekülen ersetzt. Diese beugen zwar nicht durch ihre bloße Anwesenheit allein, aber durch Überlappungszonen mit ihren Nachbarn, wodurch lokal erhabene, Kontrastmittel ausschließende Areale entstehen. In diesem Fall wird das Verhalten der C-terminalen zwei Drittel des Myosinmoleküls betrachtet. Wenn sich der Differenzteil zum vollständigen Moleküls nicht unsystematisch verhält, ist es also letztlich unerheblich, ob sich der N-Terminus eines gegebenen Moleküls durch die Überlappung mit einem Nachbarn kenntlich macht oder durch die Anwesenheit einer globulären Köpfchen-Domäne.

4.4.1 Subfilamente

Die Molekülmodelle in Abschnitt 4.3 zeigen, wie in eindimensionalen Darstellungen die Streifungen von Parakristallen auch speziell für das Fragments 2-19 erklärt werden können. Die Interpretation betont dabei, dass die lokale Kombination von Einzelmolekülen besonders dann nicht zweifelsfrei abgeleitet werden kann, wenn die Superposition viele unterschiedliche Schichten mit einschließt. Diese gängigen Schichtdarstellungen sind also als ein Hilfsmittel zu betrachten und müssen nicht notwendigerweise als solche vorliegen: Molekülkombinationen, die in diesen Visualisierungen flächig dargestellt werden, können lokal begrenzt auftauchen, dort zum Färbeverhalten beitragen und einen gleichartigen Beitrag an einer äquivalenten, seitlich versetzten Stelle leisten. Das eindimensionale Ergebnis, das bei fehlender Ordnung in der Fläche diese Beiträge gleichsam in der 2. Dimension verwischt, bliebe dasselbe. In dem Maße, in dem sich eine Struktur differenziert, zum Beispiel durch Ordnung in der Fläche, kann nun auch das Feindetail auf engstem Raum stärker hervortreten.

Für das Fragment 2-1 waren zwei alternative Schichtmodelle vorgestellt worden, die bei unterschiedlicher Primärversetzung zu demselben Überlagerungsergebnis führen (Kap. 4.3.2). In einem Fall kann man ein Molekül-Dimer von 43,5 nm versetzten Stäben mit Wiederholung nach 87 nm formulieren, im anderen ein 14,5 nm versetztes Molekülpaar mit Wiederholung nach 58 nm. Eine Kombination aus drei der ersteren Formationen sind nötig, um ein 14,5 nm-Muster zu erzeugen, zwei der letzteren Muster erzielen das gleiche Ergebnis. Die Darstellung in Abb. 4-4 B betont unter anderem die 58 nm-Kombinationen von Molekülen und den Überlappungsbereich zwischen ihnen, der unter Verwendung von 43,5 nm versetzten Molekülen auf der ersten Ebene nicht entsteht. In einer unipolaren Anordnung des Fragments 2-19, die zudem Anzeichen eine lateralen Differenzierung aufweist, sollten solche

Überlappungsbereiche räumlich enger Nachbarn sich durch helle, 4,5 nm breite Knötchen hervortun. Dies ist in den 116 nm-periodischen Parakristallen der Fall (Abb. 3-30). Das Feindetail dieser Knötchen jedoch variiert, die maximale Ausdehnung in Längsrichtung liegt im Bereich der oben modellierten 4,5 nm. Die periodische Wiederkehr eines gegebenen Feindetails liegt bei 116 nm. Auch dieser Umstand favorisiert die Beteiligung einer Musterverschiebung von 58 nm, da dieser Abstand mit 43,5 nm-Versetzungen nicht entsteht. Startpunkt der Modellbildung stellt damit das in Abb. 4-4 B dargestellte Molekülmodell dar. Darüber hinaus müssen jedoch weitere Strukturkomponenten beteiligt sein, die ein helikal beugendes Verhalten hervorrufen und eben jene insektenspezifische Beugung erzeugen.

Anzeichen einer seitlichen Regelmäßigkeit im Abstand von 11,2 nm deuten auf eine Verwandtschaft zu kristallinen Zusammenlagerungen in *E.coli*-Zellen. Auf der Basis der Interpretation des 11,2 nm-Abstandes aus Kap. 4.1.1 könnte also ein Supercoil von Untereinheiten mit einem Durchmesser von 4 nm von entscheidender Bedeutung für die 3-dimensionale Organisation sein. Diese Untereinheiten werden im Folgenden als Strang bezeichnet, das Supercoil als Subfilament. Wenn diese Deutung zutrifft, dann sollte es möglich sein, Anzeichen einer sinusoiden Modifikation entlang der Achse des betrachteten Parakristalls zu finden, die weitere Rückschlüsse auf den *pitch* eines solchen Supercoils zulassen:

Bei genauerer Betrachtung des 116 nm-Musters in Abb. 3-30 C fällt auf, dass sich, geht man von einem beliebigen Punkt extremer Färbung aus, im Abstand von 58 nm die exakt entgegengesetzte Färbung einstellt: Ein solches Verhalten ist konsistent mit einer aufgesetzten, das übrige Muster überlagernden Sinusfunktion der Periode 116 nm. Es scheint also der sehr attraktive Fall denkbar, dass der *pitch* der Superstruktur mit der Wiederholung von Molekülen verwandt ist oder gar zusammenfällt.

In der Diskussion des 58 nm-periodischen Tubus war dargelegt worden, wie auch dort eine vergleichsweise schwache sinusförmige Strukturkomponente mit 116 nm-Frequenz existieren könnte. Dort war unter anderem ein Doppel-Helix-Modell zur Erklärung herangezogen worden. Der entscheidende Unterschied zur 58 nm-Eigenschaft der zylinderförmigen Strukturen (s. Kap. 4.3.3) liegt darin, dass bei den 116 nm-periodischen Parakristallen Molekülüberlappungen (nicht kontinuierlich) das periodische Muster bilden. Die 58 nm-Periode des Tubus (Abb. 3-28) stellt ein vergleichsweise schwaches, überlagerndes Merkmal dar, während die Molekülüberlappungen dort das 14,5 nm-Muster bilden.

Im Fall des 116 nm-Parakristalls erzeugt die Superstruktur kein eigenes Färbungsmerkmal, sondern wirkt sekundär durch die Orientierung von Überschneidungsbereichen im Raum. Die Beugung des 116 nm-Parakristalls lässt sich eindeutig indizieren; eine *selection rule*, die alle auftretenden Ordnungen auf der Grundlage einer 232 nm Periode ergibt, konnte nicht formuliert werden. Kann also ein 116 nm-*pitch* des Supercoils vorliegen? In dieser diskontinuierlichen Helix tragen die einzelnen Molekülversetzungen in unipolarer Gesamtkonfiguration zur

Gesamterscheinung des Knötchenmusters bei und definieren so die Beugung. Oben waren Überlappungsbereiche im Abstand von 58 nm als zentrale Komponente der Organisation als wahrscheinlich eingestuft worden. Das Färbeverhalten scheint dem durch die Abwesenheit einer vergleichbaren Mikrostruktur bei $x+58$ nm zunächst zu widersprechen, wenngleich bei 116 nm wieder kongruent. Ein 58 nm versetzter Partner hingegen führt dann nicht zu einem ähnlichen oder gleichen Färbungsverhalten an dieser Stelle, wenn die übergeordnete Struktur diese Überlappung bei 58 nm vom Betrachter / der Oberfläche des Parakristalls weg orientiert, wie dies bei einem *pitch* der Superstruktur von 116 nm der Fall ist; gleichwohl tritt eine exakte Wiederholung bei 116 nm wieder an die Oberfläche. Der Umstand der Färbungsumkehr bei 58 nm muss bei einem *pitch* von 116 nm weiterhin bedeuten, dass die einzelnen diskontinuierlichen Anteile – sprich Molekülüberlappungen – in den beiden Strangpartnern exakt gegenläufig organisiert sind. Mit anderen Worten, während im Einzelstrang eine Wiederholung von Feindetail bei 58 nm schon als wahrscheinlich eingestuft worden ist, so darf es im Partnerstrang an keiner korrespondierenden Stelle eine Entsprechung geben, da dies wegen der Zweifach-Symmetrie des Supercoils mindestens punktuell zu ähnlichem Färbungsverhalten bei $x+58$ nm führen würde. Unter diesen Voraussetzungen ist also ein Supercoil-*pitch* von 116 nm - auch unter Berücksichtigung der Färbungsmodulation aus Kap. 4.3.3 - möglich und sinnvoll.

Diese Beobachtungen können unter Einbeziehung der oben beschriebenen helikalen Struktureigenschaften und der Interpretation des 11,2 nm-Beugungspunktes aus Abschnitt 4.1.1 zu einem Modell vereinigt werden, das nicht nur alle bis hierhin ausgeführten Beobachtungen auf sich vereinigt, sondern darüber hinaus auch unterschiedlichste Aspekte bis dato publizierter Befunde zur Köpfchenanordnung und Rückgratstruktur in Myosinfilamenten asynchroner Muskeln erklären kann. Das Modell wird in Anlehnung an die vorangegangenen Ausführungen auf der Grundlage folgender Parameter entwickelt:

- A. Die Moleküle sind in Strängen mit einem Durchmesser von ca. 4 nm organisiert.
- B. Ein Strang kann damit durchschnittlich aus mindestens 2 Stäben bestehen.
- C. Diese Stränge bilden ein zweifach-symmetrisches Supercoil (Subfilament).
- D. Dieses Subfilament liegt parallel zur Hauptachse der Anordnung.
- E. 58 nm versetzte Überschneidungsbereiche stellen ein zentrales strukturgebendes Element der Anordnung dar.
- F. Bei achsenparalleler Ausrichtung von Supercoils ist eine Molekülwiederholung bei 116nm zwangsläufig und
- G. ein Supercoil-*pitch* von 116 nm wahrscheinlich.
- H. Die Einzelstränge des Supercoils/Subfilaments sind „auf Lücke“ mit Molekülen besetzt.

- I. Das Ergebnis der Zusammenlagerung von Subfilamenten und die daraus resultierende Symmetrie der Einzelkomponenten muss der *selection rule* $8m \pm 3$ genügen.
- J. Einzelne Grundeinheiten sollten nicht voneinander verschieden sein.

Der letzte Punkt bedarf einer gesonderten Betrachtung, da er sich nicht direkt aus den Befunden herleiten lässt. Er ist eine Fortführung eines zentralen Punktes aller bisher publizierten Vorstellungen zur Zusammenlagerung von Myosinmolekülen, dem der Äquivalenz von Einzelkomponenten. Sehr orthodoxe Vorstellungen führen dieses Prinzip bis auf die Ebene des Einzelmoleküls hinab und fordern eine gleiche Umgebung für alle am Filamentaufbau beteiligten Moleküle. So leitet Squire für alle Filamente ein „curved molecular crystal“-Modell ab (Squire, 1973), in dem alle Stäbe exakt gleichen Pfaden (*crystal*) um den Filamentschaft folgen. Sie liegen dabei nicht parallel, sondern leicht geneigt (*curved*) zur Filamentachse.

Verschiedenen Ergebnisse widersprechen diesem Konzept. So ist eine Substrukturierung des Filamentrückgrades für Vertebraten- wie Insektenfilamente gezeigt worden. Das bedeutet, die Moleküle können im Filament-*backbone* keine äquivalenten Positionen einnehmen. Darüber hinaus kann nach Beinbrech und Schmitz wenig Zweifel daran bestehen, dass die einzelnen Elemente (Subfilamente) im Insektenfilament achsenparallel verlaufen (Beinbrech *et al.*, 1990; Schmitz *et al.*, 1993). So ist auch das Wray'sche Modell von 12 centrosymmetrischen, geneigten Subfilamenten für den Insektenmuskel (Wray, 1982) nicht haltbar. Im Lichte der zunehmenden Evidenz von definierten Untereinheiten zieht Squire auch Subfilament-Modelle in Betracht (Chew & Squire, 1995). Trotzdem favorisiert er Modelle mit äquivalenten Molekülpositionen und schreibt jede Störung perfekter Ordnung unterschiedlichen Köpfchen-Konformationen oder akzessorischen Proteinen zu (Squire *et al.*, 1998). Jedoch existiert derzeit keine Modellvorstellung, die zusätzlich zur Nicht-Äquivalenz von Einzelmolekülen auch voneinander unterschiedliche Untereinheiten zu Grunde legt. Die in allen Filamentformen hochgradig symmetrischen Köpfchenverteilungen lassen dies auch kaum zu.

Wäre im Muskel durch eine Beteiligung von Hilfsproteinen noch eine unregelmäßige Zusammenlagerung von Molekülen zu Superstrukturen denkbar, die erst sekundär eine gleichmäßige Matrix von Köpfchen erzeugen, so ist dies im Falle von *in vitro*-Ordnungen kaum noch vorstellbar. Hier liegt es besonders nahe, gleiche Substrukturelemente miteinander zu kombinieren, da die Zunahme an Freiheitsgraden die Wahrscheinlichkeit der spontanen Entstehung einer regelmäßigen Struktur drastisch senkt. Dies gilt sowohl für die Stränge eines Supercoils als auch für daraus entstehende Subfilamente. Eine maximal plausible Anordnung kombiniert gleichartige Stränge zu gleichartigen Subfilamenten, die die Gesamtstruktur aufbauen:

4.4.2 Molekülpositionen im Subfilament

Aus den Parametern A-I leitet sich folgendermaßen ein plausibles Subfilament ab:

Innerhalb eines 4 nm dicken (A) Stranges des zweifach symmetrischen Supercoils (C) ergeben sich 4,5 nm breite Überlappungsbereiche zweier Moleküle im Abstand von 58 nm (E,F). Der Durchmesser des Stranges erlaubt innerhalb desselben zwei Reihen hintereinanderliegender Moleküle („Adern“), die identisch aufgebaut sein sollten (A,B,I). Vier von acht der 14,5 nm-Ebenen der 116 nm-Periode sind damit besetzt; die übrigen werden durch den Partnerstrang (C) ergänzt, der gleich aufgebaut ist (I) und dessen Moleküle „auf Lücke“ angeordnet sind (H). Weder die Versetzung des zweiten Satzes von Molekülen im Strang gegenüber den Primärmolekülen noch die dreidimensionale Organisation dieser 4 Moleküle innerhalb des Stranges lassen sich direkt ableiten. Nach McLachlan und Karn sollten speziell auf dieser ersten Ebene der Interaktion jedoch 14,5 und 43,5 nm-Versetzungen vorherrschen. Je nach Primärversetzung im Strang resultiert zwangsläufig eine bestimmte Versetzung von Strängen zum Subfilament (H):

Ausgehend vom wahrscheinlicheren Fall einer 14,5 nm-Versetzung von Adern innerhalb eines Stranges ergibt sich die Strang-Verschiebung zu 29 nm. Letztere, dem McLachlan/Karn-Schema nach un favorisier te Primär-Versetzung auf dieser Ebene anzunehmen, steht nicht im Widerspruch zu deren Theorien, sondern ist im Gegenteil in genau dieser Form Teil ihrer Überlegungen: Sie ziehen bei der Bildung von Microfilamenten (Paaren von gewundenen *coiled coils*; hier: Strang), einen Strang-*pitch* von 58 nm in Erwägung und führen aus, dass für geladene Stränge mit versetzten Molekülen eine Ladungs-Paarung im Abstand von der Hälfte des Strang-*pitches*, also 29 nm optimal ist (McLachlan & Karn, 1983). Die Alternative einer nicht bevorzugten Primärinteraktion von 29 nm versetzten Adern würde die Organisationsebenen umkehren und zu einer 14,5 nm Versetzung zwischen den Strängen führen.

Zwei Stränge bilden ein 116 nm periodisches (G) Supercoil, auf das sich die Moleküle in einer der zwei genannten Arten verteilen: Verschiedene Darstellungen von 116 nm langen Ausschnitten dieser beiden Subfilament-Modelle sind in Abb. 4-7 A und B dargestellt. Dabei zeigt die erste Teilabbildung jeweils den schematischen Molekülaufbau, der zweite Teil die 3-dimensionale Verteilung der Überlappungsbereiche im 116 nm-Supercoil von 4nm dicken Strängen und die letzte Unterabbildung eine flächige Projektion dieser Überlappungsbereiche des jeweiligen Subfilament-Modells. Die Abbildung demonstriert, dass in Projektion die Modelle nicht voneinander zu unterscheiden sind. Da im Weiteren mit Projektionen gearbeitet werden wird, können die Schlussfolgerungen in gleicher Weise auf beide Modelle zutreffen, jedoch erscheint das Subfilament in B mit obiger Argumentation plausibler. Es ist die Konvolut ion der Parallelkomponenten der Molekülanordnung in Abb. 4-4 B, wobei der erste Strang alle parallelen Moleküle der ersten Ebene beinhaltet, der Partner-Strang die der zweiten, um 29 nm versetzten Lage. Der Drehsinn eines solchen Supercoils ist mit den vorliegenden Informationen nicht zu eruieren. Letztlich leitet er sich über die verschiedenen Organisationsebenen bis hinunter zur α -Helix aus minimalen Änderungen in deren Wasserstoff-

brücken ab. Die Händigkeit spielt aber für die nachfolgenden Überlegungen keine Rolle und ist in den Darstellungen willkürlich linksgängig gewählt.

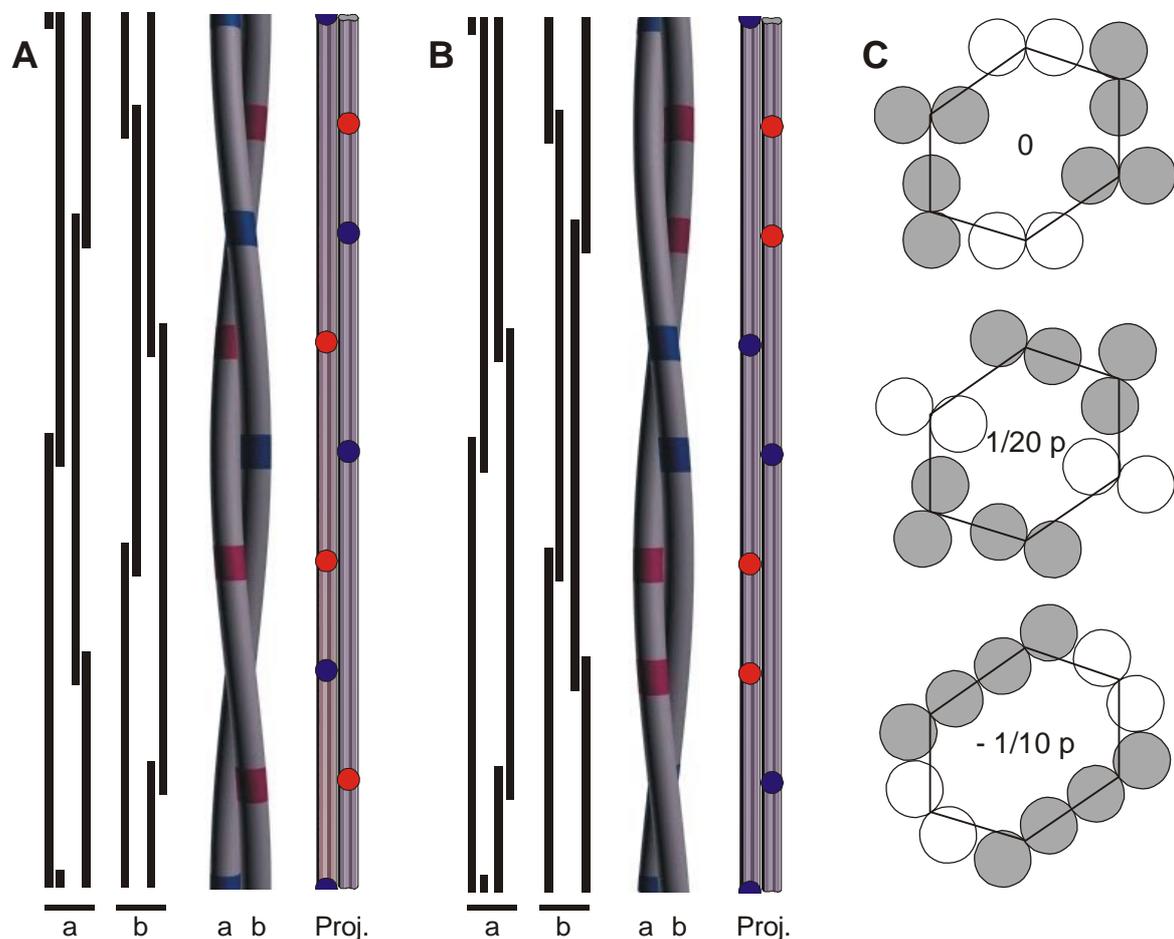


Abb. 4-7: Subfilamente und deren Rotations-Orientierung im Longley-Gitter

- A:** Subfilament A (116 nm): 29 nm Versetzung von Adern innerhalb eines Stranges, 14,5 nm Versetzung von Strängen a und b zum Subfilament; Doppel-coil-Subfilament (*pitch* 116 nm) aus diesen Strängen mit strangbezogener Färbung von Überlappungszonen; Projektion dieses Subfilaments
- B:** Subfilament B (116 nm): 14,5 nm Versetzung von Adern innerhalb eines Stranges, 29 nm Versetzung von Strängen a und b im Subfilament; Doppel-coil-Subfilament (*pitch* 116 nm) aus diesen Strängen mit strangbezogener Färbung von Überlappungszonen; Projektion dieses Subfilaments
- C:** Drei Ebenen einer Longley-Anordnung von Subfilamenten, die die gegenseitige Orientierung der ortsfesten (achsenparallelen) Subfilamente zueinander demonstrieren: vier „knobs-into-hole“-Packungen, zwei „side-by-side“-Anlagerungen. Positionen relativ zur Anfangsstellung sind angezeigt. Die Seiten des eingezeichneten Sechsecks verbinden die Rotationspunkte der einzelnen Subfilamente.

Die projizierten Darstellungen in Abb. 4-7 A und B deuten schematisch eine Vierteilung in Anlehnung an die oben definierten „Adern“ an. Alle hier herzuleitenden Modellvorstellungen beschränken sich auf den Strang, also die nächst höhere Organisationsebene, wie er auch in Filamentquerschnitten visualisiert worden ist (Beinbrech *et al.*, 1988; Beinbrech *et al.*, 1992).

Wie das Feindetail eines Stranges als eigene Strukturebene (McLachlan & Karn, 1983) organisiert ist, kann derzeit noch nicht abgeleitet werden. Eine Zweiteilung würde allerdings mit Modellen zur Untergliederung von Vertebraten-Subfilamenten kongruieren. Die gängigen Vorstellungen zur Organisation von LMM-Molekülen in Vertebraten-Filamenten und entsprechenden parakristallinen Anordnungen gehen von zwei um 43 nm versetzten Monomeren als Aggregationseinheit aus, die sich ebenfalls auf zwei „Adern“ aufteilen (Pepe, 1967). Von solchen Strängen müssten sich 3 im Fundamentalabstand von 14,5 nm miteinander kombinieren, um innerhalb eines Subfilamentes alle Level zu besetzen. Die strukturell korrespondierende Beobachtung ist eine dreifach-symmetrische Untergliederung des Subfilamentes in Vertebraten-Muskeln (Pepe *et al.*, 1986a). Übertragen auf den vorliegenden Fall würde eine 58 nm-periodische Wiederkehr von Dimeren konsequenterweise eine Aufteilung in vier Untereinheiten pro Subfilament bedeuten (zwei der oben sogenannten „Adern“ in jedem Strang). Um diese tatsächlich beobachten zu können, müsste allerdings das Präparat die Auflösung von Einzelmolekülen erlauben. Als Gemeinsamkeit bleibt jedoch festzuhalten, dass in beiden Subfilament-Modellen eine kontinuierliche Besetzung eines jeden Köpfchen-Levels gegeben ist.

4.4.3 Kombination von Subfilamenten

Um das in Abb. 4-7 A/B dargestellte Subfilament zu validieren, muss nun in der folgenden Stufe eine Kombination gefunden werden, die die helikalen Beugungsphänomene zu erklären in der Lage ist, letztlich also die *selection rule* $l = 8m \pm 3n$ erfüllt.

Da aufgrund der immanenten Unordnung des Parakristalls nicht alle Effekte nachgestellt werden können, bietet sich eine idealisierte Betrachtung eines Ausschnittes der optimalen Anordnung an: Wenn tatsächlich filamentähnliche Einheiten am Aufbau des Parakristalls beteiligt sind, so lässt sich dies auf der Grundlage des Subfilament-Modells nach Longley überprüfen, indem man innerhalb des in Abb. 4-1 B dargestellten Kristalls von Subfilamenten mit 4 nm-Strängen eine Formation aus 6 Subfilamenten definiert und isoliert betrachtet. In Abb. 4-7 C sind von einem solchen Filamentkörper innerhalb des Gitters drei verschiedene Schnittebenen hervorgehoben. Die geometrischen Versetzungen einzelner Subfilamente gegeneinander sind durch die Beziehungen der dichtesten Packung vorgegeben und in den Teilabbildungen visualisiert: Bei einem Supercoil-*pitch* von 116 nm sind "knobs-into-hole" Packungen gleichbedeutend mit einer 29 nm-Versetzung ($\frac{1}{4}$ *pitch*; s.a. Abb. 4-1 A).

Subfilament-Paare, deren coil-Bäuche einander zugewandt sind, haben eine geometrische Versetzung von 0 nm oder 58 nm. Einen Supercoil-*pitch* von 116 nm vorausgesetzt, sind die Beziehungen der Subfilamente zueinander klar definiert: Vier der Versetzungen entsprechen ± 29 nm, zwei davon sind gleichbedeutend mit 0 bzw. ± 58 nm. Allerdings gelten diese numerischen Beziehungen zunächst nur für die Geometrie der Superstruktur. Direkt ist der

Rückschluss auf korrespondierende Molekülversetzungen nicht möglich. Bildlich wird dies durch die Vorstellung von durch Drehung aneinander vorbeigleitenden Schrauben nachvollziehbar. Eine Minimalableitung aus der Anordnung, die davon ausgeht, dass gleiche geometrische Beziehungen gleichen Versetzungen entspricht, stellt die Folge a,a,b,a,a,b dar. Verschiedenste weitere Einschränkungen lassen nur wenige Kombinationen zu, die alle Beobachtungen auf sich vereinigen:

- I) Die Schrittweite jeder Versetzung muss ein n-faches von 14,5 nm darstellen.
- II) Die Summe aller 6 Einzelversetzungen muss 0 (bzw. 116 nm) ergeben (integrale Strangzahl N einer helikal-kristallinen Anordnung).
- III) Jede Rotationssymmetrie schränkt Punkt II) weiter ein. Die Versetzungsfolge aab,aab legt eine zweifache Rotationssymmetrie nahe. Diese ist nach allen bislang vorliegenden Erkenntnissen eine Mindestanforderung an die Symmetrie des Insektenfilaments, was darüber hinaus eine 3- und eine 5fache Symmetrie ausschließt. Eine gleichfalls zu fordernde Vierfach-Symmetrie (Morris *et al.*, 1991; Schmitz *et al.*, 1994b) kann durch die Kombination von 6 Elementen nicht direkt erzeugt werden. Bei zweifacher Rotationssymmetrie ist die Summe $a+a+b=0$

Es resultieren genau vier Kombinationen von Subfilament-Versetzungen:

Modell I: $-14,5 - 14,5 + 29$ (-87) nm

Modell II: $-29 - 29 + 58$ (-58) nm

Modell III: $-43,5 - 43,5 + 87$ (-29) nm

Modell IV: $-58 - 58 \pm 0$ (± 116) nm

Die übrigen sind spiegelbildliche Entsprechungen der aufgelisteten, da z.B. $+72,5$ nm bei einer 116 nm Periode mit $-43,5$ nm gleichzusetzen ist; das Ergebnis invertiert lediglich die Händigkeit der Helices, wie auch die Umkehrung der Vorzeichen.

Das Resultat der Kombination von Subfilamenten muss eine helikale Anordnung von Molekülen/Molekülenden sein, die die insektenspezifische *selection rule* erfüllt. Um das verblüffende Ergebnis einzelner Subfilament-Kombinationen richtig einordnen zu können, sei noch einmal kurz auf die Grundlagen helikaler Symmetrien zurückverwiesen. Es war in Kap. 4.3.5 dargelegt worden, wie stark die Einschränkungen sind, die in einer Multikomponenten-Anordnung Helices einer bestimmten Spezifikation kreieren. Die vorgestellten Versetzungsoperationen der Modelle I-IV lassen nicht direkt erkennen, wie tatsächlich Helices mit den zu fordernden Eigenschaften entstehen können. So ist im Einzelnen nicht unmittelbar abzuleiten, wie zum Beispiel bei grundsätzlich 2facher Rotations-Symmetrie ein *pitch* von 77,3 nm entstehen kann. Wie eine 4fache Symmetrie mit einem der IFM-spezifischen *selection rule* entsprechenden *pitch* von 154,7 nm durch 6 Versetzungsoperationen entstehen kann, ist ebenfalls nicht offensichtlich. Trotz dieser scheinbaren Komplikationen sind Kombinationen

der Subfilamente aus Kap. 4.4.2 möglich, die die geforderten helikalen Beugungscharakteristiken erfüllen (Abb. 4-8):

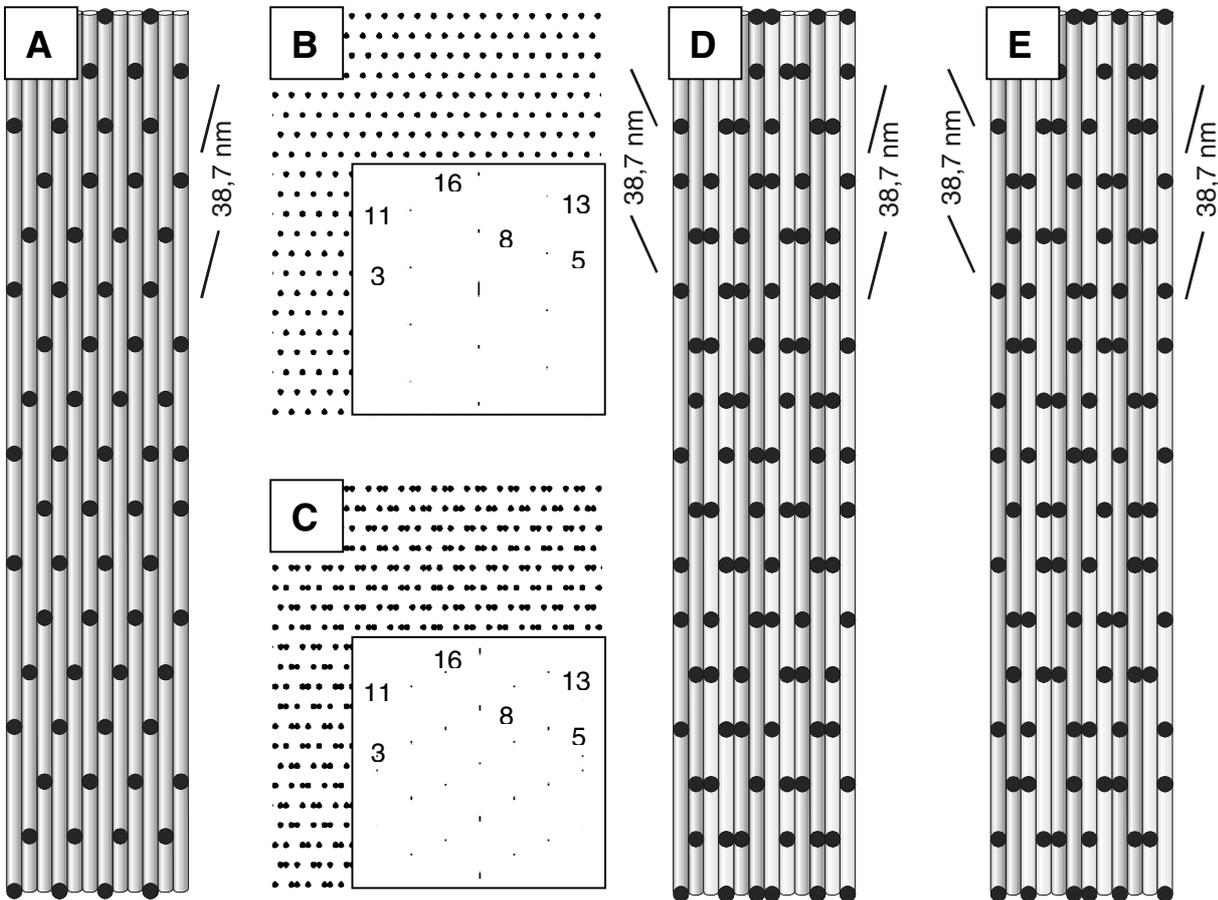


Abb. 4-8: Molekülpositionen im Insektenfilament: Beugungsphänomene

Flächige Darstellung der Molekülpositionen eines Filaments aus 12 Strängen (4 nm)

A: Übertragung der Molekülanordnung nach Wray auf parallele Stränge

B: Beugung einer infiniten Wiederholung der Positionen in A; die eingezeichneten Zahlen entsprechen Ordnungen von 116 nm (vgl. Abb. 4-6; erstes meridionales Maximum bei 14,5 nm, der 8. Ordnung)

C: Beugung einer infiniten Wiederholung der Positionen des Modells I (s. D); die eingezeichneten Zahlen entsprechen Ordnungen von 116 nm (vgl. Abb. 4-6)

D: Modell I: Versetzungssequenz der Subfilamente (s. Abb. 4-7): - 14,5 nm; - 14,5 nm; + 29 nm

E: Modell II: Versetzungssequenz der Subfilamente (s. Abb. 4-7): + 29 nm; - 58 nm; + 29 nm

Die in Abb. 4-8 gewählte Darstellung ist durch die flächige Projektion des dreidimensionalen Aufbaus ("Helix-Netz") geringfügig verzerrt und kann so die tatsächlichen Verhältnisse nur näherungsweise darstellen, erlaubt aber die Überprüfung wesentlicher helikaler Grundeigenschaften durch Beugung des Musters. Letzteres beruht im Wesentlichen auf der Darstellung der Molekülüberlappungen in der Fläche nach Abbildung 4-7 A/B.

Von den Kombinationen I-IV generieren die ersten beiden tatsächlich eine Musterverteilung, die den Anforderungen der Insektenfilament-spezifischen *selection rule* genügt (Beugung in Abb. 4-8 C für Modell I). Die Beugungen beider Modelle (Abb. 4-8 D und E) sind weitestgehend identisch und in den hier zu diskutierenden Aspekten deckungsgleich. Zur besseren Einordnung der Ergebnisse wurde ein Modell in Anlehnung an Wray herangezogen, das aus Gründen der Vergleichbarkeit lediglich dadurch modifiziert wurde, dass die beugenden Einheiten auf einem System 4 nm breiter paralleler Subfilamente angeordnet sind. Dies hat nur eine geringfügige Verzerrung im Vergleich zur komplett regelmäßigen Darstellung des Originals (s. Abb. 4-6 D) zur Folge - der von Wray's Modell abzuleitende Kippungswinkel (tilt) der Subfilamente zur Achse beträgt $1,8^\circ$.

Die Modellbeugung nach Wray (modifiziert) zeigt auch in der leicht derangierten Form die korrekte Verteilung von Intensitäten im Hinblick auf den Meridian. Die Beugung ist in äquatorialer Richtung wie in Kap. 4.3.5 theoretisch ausgeführt durch den seitlichen Abstand der modellierten Subfilamente (4 nm) bestimmt, d.h. durch ein Vertikal"sieb" gerastert („sampling“). Die Lage der Beugungspunkte entspricht also nicht der Position von Maxima im n/l -plot aus Abb. 4-6 B. Der innerste horizontale Abstand entspricht 12 nm ($3 * 4$ nm), da die Anordnung sich nach 3 Subfilamenten wiederholt.

Modell I und II können nicht nur in gleicher Weise die geforderte Intensitätsverteilung generieren, sondern weisen darüber hinaus eine Kombination von Eigenschaften auf, die sich mit weiteren publizierten Befunden am Insektenfilament korrelieren lassen. Der Wechsel der starken off-meridionalen Beugungsmaxima, die denen im Vergleichsmodell entsprechen, ist evident, während auf dem Meridian gleichfalls nur Ordnungen von 14,5 nm präsent sind ($(n*8)$ te Ordnungen von 116 nm; s. Abb. 4-6 B).

Im Unterschied zur Beugung der tatsächlichen Struktur (Abb. 3-30 D) ist die erste meridionale Ordnung bei 14,5 nm naturgemäß stark betont, da in der Darstellung alle beugenden Einheiten im 14,5 nm-Liniensystem durch ihre Darstellung in der Ebene gleich gewichtet sind. Dieser Umstand ist eine Folge der flächigen Projektion des Gitters und dessen Untereinheiten. Der Rückblick auf die 3-dimensionale Darstellung der Subfilament-Modelle in Abb. 4-7 verdeutlicht, dass die Einbeziehung der räumlichen Orientierung einzelner Überlappungszonen die 14,5 nm-periodischen Eigenschaften sichtbar stört: einzelne Überlappungszonen sind vollständig verdeckt, andere verzerrt. Dass der 14,5 nm-Abstand eine wesentliche Strukturkomponente auch im Original in Abb. 3-30 darstellt, zeigt die Rekonstruktion eines 14,5 nm-periodischen Punktemusters in Abb. 3-30 G. Im Gegensatz zu eindimensionalen Projektionsmustern können die Effekte der räumlichen Anordnung einzelner Molekülüberlappungen kaum vollständig simuliert werden, da insbesondere die räumliche Orientierung von Einzelmolekülen innerhalb eines Stranges nicht abgeleitet werden kann. Weitere Einzelheiten des axialen Musters, die die Beugung auf dem Meridian mit beeinflussen, wie zum Bei-

spiel ein *Positiv-staining* von Ladungsmustern, könnten ebenfalls nur in Kenntnis der exakten Molekülpositionen mit berücksichtigt werden. Jedoch simuliert diese Darstellung einen anderen Teilaspekt nativer Filamente: In letzteren sind die einzelnen Molekülpositionen durch die Anwesenheit der Köpfchen auf der Oberfläche des Filaments äquivalent gewichtet. Aus diesem Grund ist auch in Beugungen isolierter Filamente die meridionale Ordnung bei 14,5 nm stark betont (s. Abb. 1-3 A).

Die sich in den Transformaten der Modelle nach Wray und den hier abgeleiteten Modellen (vgl. Abb. 4-8 B und C) entsprechenden off-meridionalen Intensitäten sind Ausdruck der gleichen rechtshändigen, viersträngigen Helices in beiden Modellen (Betrachtung der Abb. 4-8 A und D aus spitzem Winkel entlang der Markierungen).

Gleichzeitig entstehen jedoch bei der Beugung der Modelle gegenüberliegende Intensitäten auf denselben *layer lines* im halben Abstand vom Meridian (entsprechend 24 nm = 6 Subfilamenten). Grundlage dieses Phänomens ist die Existenz zweier Sätze von Helices, die gegenläufig orientiert sind und die beide die Kriterien für die spezifische Helix erfüllen, indem die eine 4-strängig rechtshändig mit *pitch* 154,7 nm, die andere 2-strängig linkshändig mit *pitch* 77,3 nm verläuft: Abb. 4-8 C. Diese zwei-strängige Helix von Köpfchendichten ist von Reedy in genau dieser linksgängigen Orientierung in Muskelpräparaten gefunden worden (Reedy, 1967). Auch isolierte Bienen-Filamente zeigen einen derartigen Proteinmasse-Verlauf (Trombitas & Tigyi-Sebes, 1986). Dies trifft in gleicher Weise auf die Helices in Modell II zu, deren Nominal-Versetzungen jedoch darüber hinaus den geometrischen Versetzungen von Doppel-Helices mit 116 nm *pitch* entsprechen. Aufgrund dieser Eigenschaft ist bei sonst gleichen Beugungscharakteristiken, die keine Entscheidung zwischen den beiden vorgestellten Möglichkeiten zulassen, das Modell II zu bevorzugen.

Eine exakte Übertragung dieser Detailbefunde auf einzelne Aspekte des Beugungsbildes in Abb. 3-30 ist wegen der schon aufgelisteten Unbestimmtheiten schwierig, jedoch sei im Lichte dieser Ergebnisse noch einmal auf die Beugungslinien bei 23,2 / 8,9 / 5,5 und 4,0 nm (5., 13., 21. und 29. Ordnung von 116 nm) verwiesen, auf denen sich im jeweils ca. doppelten Abstand vom Meridian ein schwächeres gegenüberliegendes Maximum zeigt. Dies könnte selbst in dieser nicht kristallinen Form ein Ausdruck der beiden gegenläufigen Helix-Sets sein. Allerdings zeigt sich ein deutlicher Intensitätsunterschied zwischen den Maxima rechts und links des Meridians im Parakristall-Beugungsbild: das dem Meridian näher liegende Maximum ist stärker ausgeprägt. Die Transformation des Modells in Abb. 4-8 C weist diesen Effekt nicht auf. Es ist aber nicht nur möglich, sondern wahrscheinlich, dass die dreidimensionale Organisation einschließlich der dargelegten Unordnungs-Phänomene im Parakristall die beiden Helix-Sets ganz anders betont als die, wie erwähnt, verzerrte flächige Darstellung. Diese Projektion macht aber einen anderen Umstand deutlich: Die Herleitung dieser Anordnungen hat im Falle des Modells I ein Ergebnis produziert, das im Wesentlichen eine Über-

tragung und Erweiterung der ideal-symmetrischen Anordnung nach Wray auf mittlerweile etablierte parallele Subfilamente darstellt. Alle beugenden Einheiten in Abb. 4-8 A sind in 4-8 D (nicht in exakt gleicher Weise in Abb. 4-8 E) vorhanden; die einzige weitere Modifikation ist die systematische Ergänzung auf 6 Moleküle pro Köpfchen-Level. Die Aufstockung auf eine höhere Köpfchenzahl ist auch theoretisch eine logische Folge aus der Annahme gleicher Subfilamente, die bislang Grundlage jedweden Modellbildungsversuches war: Bezogen auf die unstrittigen 12 Subfilamente bedeuten nämlich 4 Moleküle pro 14,5 nm-Level eine durchschnittliche Molekülzahl von nicht integralen 2,6 pro 116 nm eines jeden Strangs, was bei einer Molekülwiederholung bei Position 116 nm zwangsläufig ungleiche Stränge bzw. bei gleicher Besetzung der Stränge ungleiche Köpfchenebenen nach sich zieht. Die einzige im zu diskutierenden Rahmen sinnvolle Anzahl von Molekülen pro Level, die sowohl die 14,5 nm-Ebenen als auch parallele Subfilamente gleichmäßig besetzt, ist sechs.

Trotz der Komposition aus 6 Untereinheiten weisen die Modelle also nicht nur die nach Wray, Morris und Schmitz zu postulierende Viersträngigkeit auf, sondern auch die von Reedy und Trombitas beobachtete Zweisträngigkeit in Gegenrichtung. Das Modell einer 6-strängigen Helix nach Squire ist insofern eingebunden, als sich 6 Moleküle auf einem Level wiederfinden, die aber eben nicht äquivalent verteilt sind. Die vorgestellten Anordnungen, abgeleitet aus den Beobachtungen am 116 nm-periodischen Parakristall, können also Anteile aller publizierten Köpfchenanordnungen von asynchronen Flugmuskeln auf sich vereinigen (s. folgendes Kapitel).

4.4.4 Einordnung und Implikationen des Modells

Im vorangegangenen Abschnitt war dargelegt worden, dass und wie eine parakristalline Anordnung Informationen zum möglichen Aufbau von Insektenfilamenten liefern kann. Das abgeleitete Modell war zunächst auf der Basis existierender Vorstellungen und Beobachtungen von Köpfchen-Mustern des nativen Filaments von *Lethocerus* validiert worden. Im Folgenden soll es intensiv im Hinblick auf seine Kompatibilität zu anderen, darüber hinaus gehenden Befunden und Modellvorstellungen überprüft werden.

4.4.4.1 Sarkomer-übergreifende Aspekte

Auf der Ebene des Myofilament-Gitters asynchroner *Lethocerus*-Muskeln war schon eingangs ausgeführt worden, wie eine gemeinsame Periode von Aktin-"targets" und Myosinkopf-Helices in außergewöhnlicher Weise dazu geeignet ist, das Wechselspiel zwischen den Filamentsystemen optimal aufeinander abzustimmen (Abbott & Cage, 1984). Die Vorstellung, dass die Dehnungsaktivierung dieses Muskeltyps auf der Modifizierung der Querbrücken-Anheftungsmöglichkeiten beruht (Pringle, 1978), wurde von Wray (Wray, 1979a) unter Berücksichtigung seiner Myosin-Gitterpunkte weiterentwickelt: Die Anordnung der Aktin-

"targets" um ein gegebenes Myosinfilament ist derart, dass sich eine Übereinstimmung in *pitch* (154,7 nm) und Strangzahl mit der von ihm geforderten Vier-Start-Köpfchenhelix ergibt. Dadurch ist es möglich, in der Art eines Schaltmechanismus' Zustände minimaler und maximaler Überlappung zu konstruieren. Ein geringer Dehnungsbetrag könnte also ein Hineingleiten in die „on“-Position bedeuten – eine genial einfache und rein geometrische Erklärung der oszillatorischen Funktionsweise.

Leider ist der „match“ dieser als „match-mismatch“ bezeichneten Hypothese nicht optimal: zwar sind die vier Helices in Deckung zu bringen, jedoch existiert keine „rhythmische“ Übereinstimmung der Anzahl der Helixunits: 6 Aktinfilamente umgeben ein Myosinfilament, während die Vierstrang-Helix auf dem dicken Filament 10,6 (nicht 12) Elemente pro Windung aufweist. Einzelne Querbrücken sind also auch innerhalb deckungsgleicher Gesamtverläufe nicht optimal positioniert.

Das Supermuster der Aktin-"targets" beinhaltet ebenfalls eine Zwei-Start-Helix mit halbem *pitch* (77,3 nm) in Gegenrichtung. Genau diese Helix wird durch die oben modellierte Anordnung zusätzlich abgedeckt, nicht jedoch durch ein homogen vierfach-symmetrisches Muster. Die beiden Gitter sind also hier deutlich effektiver synchronisiert, eine optimierte Form der Ordnung, die das „match-mismatch“-Modell der Dehnungsaktivierung ergänzt. Dieses kann nämlich aufgrund der suboptimalen *unit*-Positionen unter gewissen Voraussetzungen in Zweifel gezogen werden (Squire, 1992).

Squire versucht hier zu zeigen, dass bezogen auf das Gesamtsarkomer keine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Überlappungen von Querbrücken-"origins" und Aktin-"targets" unter Dehnung entsteht. Er leitet aus der Anwesenheit von ovalen Filamentprofilen, die in 3 unterschiedlichen Orientierungen im Bereich der M-Linie auftreten (Freundlich & Squire, 1983), ab, dass es statistisch verteilt nur 3 Rotations-Orientierungen dicker Filamente im Sarkomer gibt. Unter dieser Annahme könnten sich die entsprechenden Überschneidungsbeträge von Querbrücken-"origins" und Aktin-"targets" bei symmetrisch vierfacher Köpfchen-Helix in der Summe kompensieren. Studien zur Orientierung der Filamentkörper in verschiedenen Insektenmuskeln (Beinbrech *et al.*, 1988; Beinbrech *et al.*, 1990; Beinbrech *et al.*, 1992; Schmitz *et al.*, 1994a) zeigen jedoch, dass die Orientierung der Subfilamente im Filamentrückgrat im relaxten Zustand keine systematische Verteilung bezüglich der umgebenden Aktin-Matrix aufweist. Ohnedies wäre eine verbesserte Deckung der beiden filamentinhärenten Muster, wie sie im Fall der Modelle I und II gegeben ist, eine zusätzliche Stütze für die „match-mismatch“-Hypothese mindestens als Teil der Erklärung für die Dehnungsaktivierung.

Eine Vorstellung, nach der allein ein Vorbeigleiten, d.h. eine axiale Verschiebung, eine Deckung und optimale Bindungsfähigkeit hervorruft, würde per se keine Unterschiede von Filamentorientierungen zwischen dem erschlafften und dem Rigor-Zustand des Muskels erwarten. Falls dieser Musterabgleich hinreichend wäre, bestünde keine Notwendigkeit zur Um-

orientierung von Rotationspositionen dicker Filamente im Rigor-Zustand. Gerade dieses Phänomen einer differentiellen Ausrichtung von Filamentschäften im Rigor ist aber bei *Musca* beobachtet worden (Beinbrech *et al.*, 1990). Offenbar gibt es Positionen, in denen die Summe der Interaktionen erhöht ist; auch dieser Umstand zeigt, dass die Querbrücken nicht sechsfach-symmetrisch angeordnet sein können, da dies gleiche Anheftungswahrscheinlichkeit in jeder Position bedeutet. Mindestens bedeutet diese Präferenz in der Orientierung, dass sich nicht alle Querbrücken im Umkreis um ein dickes Filament in äquivalenten Positionen befinden (Beinbrech *et al.*, 1990).

Eine bevorzugte Rotationsorientierung dicker Filamente in *Lethocerus* zeigen auch Schmitz *et al.* (Schmitz *et al.*, 1994b), sogar in einem Zustand der dem relaxten sehr nahe kommt, indem aufgrund der Fixierungsprozedur nur sehr wenige Querbrücken gebunden sind. Überraschenderweise befinden sich dabei alle Filamente in Sarkomer-übergreifender helikaler Registrierung. Die wenigen angehefteten Querbücken markieren in deren Rekonstruktionen die zweisträngige 77,3 nm-Helix. Auch dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass diese Symmetrie innerhalb des Myosinfilaments eine gewichtigere Rolle spielt als auf der Grundlage einer einfachen Vierfach-Helix anzunehmen ist. Ungeachtet dessen entstehen nahezu quadratische Querschnittprofile der Filamente, deren Verlauf eindeutig der rechtsgängigen Helix mit *pitch* 154,7 nm folgt. Interessant ist jedoch, dass eine Rekonstruktion der Filamentoberfläche diese nur zweisträngig darstellen kann (Abb. 6 C in Schmitz *et al.*, 1994). Immerhin treten also Anzeichen beider Helices nebeneinander in ein und demselben Präparat auf. Aus der Anwesenheit dieser Superordnung müssen die Autoren schließen, dass die ovalen Rückgrat-Profile in der M-Linie nichts mit der Orientierung dicker Filamente im Sarkomer zu tun haben: Strikt vierfache Symmetrie erlaubt nur 90° voneinander abweichende Orientierungen, während 3 Ausrichtungen elliptischer Filamentumrisse (60° unterschiedlich) beobachtet wurden – scheinbar unvereinbare Ergebnisse.

Das Puzzle wird nicht gerade erleichtert durch den Umstand, dass von Schmitz *et al.* (1994) ein Filamentquerschnitt rekonstruiert wurde, der im äußeren Profil oval erscheint. Tatsächlich werden dort Subfilamente sichtbar, die in ihrer Position grob mit den sechs Grundeinheiten der hier hergeleiteten Modellanordnung übereinstimmen. Möglich wird dies dadurch, dass im zitierten Fall keine Vorfilterung auf die immer prominente 6fach Symmetrie vorgenommen wurde. Als Folge kann eine 2fache Symmetrie (Ellipse) hervortreten, obwohl dies nicht notwendigerweise resultieren muss; eine gewisse Vorselektion kann jedenfalls nur dann zu diesem Ergebnis führen, wenn eine Polarisierung des *backbone*-Querschnitts tatsächlich vorhanden ist. Anzeichen dafür sind auch in anderen Publikationen ohne Schwierigkeiten auszumachen: zweifache Rotationssymmetrien sind in Power-Spektren einzelner und gemittelter Filamente bei Beinbrech *et al.* (1988) und Schmitz *et al.* (1993) vorhanden.

Wenn aber das Filamentrückgrat polarisiert ist, wie es auch das hier hergeleitete Modell der Subfilament-Anordnung impliziert, welche bevorzugten Orientierungsintervalle gelten nun – 60° oder 90°?

Eine mindestens partielle Lösung dieses Problems präsentieren die Modelle I und II: Sie ermöglichen nämlich die Entsendung von je 4 Köpfchen in mehr als 4 rotationsäquivalenten Positionen und entschärfen damit das Argument nach Schmitz *et al.* (1993). Da die Hälfte der Moleküle in der hier vorgeschlagenen Anordnung von nicht-äquivalenten Strängen verdoppelt ist, sind mindestens 2 um ca. 30° zueinander gedrehte Orientierungen kaum unterscheidbar: durch die alternative Einbeziehung je eines der beiden Moleküle in die Brückenbildung können auf zwei Arten vier annähernd symmetrisch verteilte Köpfchen vom Filamentkörper abgegeben werden. Dies wird dazu führen, dass die Drehbeträge, die nötig sind, um Rückgratstrukturen zur Deckung zu bringen, keine eindeutige Tendenz aufweisen – nicht gegen 90°, allerdings auch nicht gegen 60° - so von Schmitz *et al.* (1993) gefunden.

Sollten die M-Linien Profile in Squire's Bildern eine bevorzugte Ausrichtung dicker Filamente anzeigen, so bleibt als mögliche Erklärung für die Diskrepanzen der unterschiedliche physiologische Zustand der Präparate, in Übereinstimmung mit der oben zitierten gezielteren Ausrichtung der Filamente im Rigor. Auch und vor allem in diesem Stadium existiert im *Lethocerus*-Muskel ein Superordnung (Reedy, 1968), die sich aber anscheinend von der weniger stark gebundener Zustände unterscheidet. Allgemein produziert die Anwesenheit von 6 Köpfchen eine Annäherung an den sechsfach-symmetrischen Zustand. Squire muss - unter der Voraussetzung, dass M-Linien-Profile eine Orientierung der Filamentschäfte anzeigen - fordern, dass jede übergreifende Ordnung im Sarkomer eine sechsfache Köpfchen-Symmetrie impliziert. Das Modell erweist sich auch hier als ein Hybrid, der scheinbar widersprüchliche Befunde zu harmonisieren in der Lage ist.

4.4.4.2 Köpfchen in der 14,5 nm-Ebene

Auch ein weiterer verwirrender Effekt scheint durch die vorgeschlagene Anordnung erklärbar. Zwar sind die erwähnten nahezu quadratischen Profile vollständig kompatibel mit einer Vierfach-Helix mit *pitch* 154,7 nm (Reedy *et al.*, 1993). Wie aber passen die sogenannten „flared-X“-Formationen im Rigor-Zustand von *Lethocerus*-Muskeln (Reedy, 1968; Reedy & Reedy, 1985) in dieses Bild? Zentraler Bestandteil dieses Strukturmotivs sind Y-förmige Köpfchen-Projektionen, die – ausgehend von einem gemeinsamen Stamm – alle 14,5 nm zwei Köpfchendichten zu benachbarten Aktin-Filamenten verteilen. Nicht nur der scheinbar mindestens ortsnahe Ursprung dieser Moleküle ist unter der Annahme einer strikten Vierfach-Symmetrie irritierend, auch die Tatsache, dass diese Aktin-Markierung einen linkshändigen Drehsinn mit 77,3 nm-*pitch* aufweist (Reedy, 1967). Die alternierende Molekülverdopplung des Modells liefert eine einfache Erklärung, indem diese Doubletten ähnlichen Ur-

sprungs am Filament einen linkshändigen, zweifach-symmetrischen Verlauf mit einem axialen Gang von 77,3 nm beschreiben. Zur Erklärung des recht offensichtlichen Konflikts zwischen einer Vierfach-Symmetrie und einem gemeinsamen Ursprung zweier Querbrücken modellieren Haselgrove und Reedy (Haselgrove & Reedy, 1984) die Interaktionen von Köpfchen und Aktin-„targets“ und folgern, dass die Querbrücken durch ihre geometrische Ausrichtung an den "target"-Zonen den *Eindruck* erwecken könnten, sie entstammten einem gemeinsamen Ursprung. Allemal einfacher erscheint es, wenn sich dort tatsächlich auch entsprechende Moleküle befinden.

Flared X's werden ausschließlich im Rigor gefunden und die Induzierung von Rigor- verwandten Zuständen durch ATP-Analoga wie AMPPNP ist begleitet von einer deutlichen Veränderung des Erscheinungsbildes gebundener Köpfchen (Schmitz *et al.*, 1996), die in Longitudinalschnitten durch tomographische Techniken auch einzeln visualisierbar sind. Da dieser Strukturwandel nicht von einer „stiffness“-Änderung (Änderung des Dehnungswiderstandes) begleitet ist (Anzahl der gebundenen Querbrücken näherungsweise konstant), sprechen die Autoren von einer Umorientierung von Köpfchenmasse. Auf der Basis des hier vorgestellten Modells käme auch die Beteiligung anderer Köpfchen in Betracht, nämlich des quasi-vierfach-symmetrischen Sets von Molekülen – begleitet von einer differentiellen Ausrichtung der Myosinfilamente (s.o.).

Im Hinblick auf die Anzahl gebundener Köpfchen ist eine weitere Überlegung interessant. Die dem *flared-X*-Motiv in Querschnitten entsprechende Strukturkomponente in Längsschnitten ist das sogenannte „double-chevron“ (Taylor *et al.*, 1984; Taylor *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1993), eine in der Aufsicht zweigeteilte Dichte auf jeder Seite eines dicken Filaments, deren Z-Scheiben zugewandter Teil weniger Aktin-orientierte Masse zu beherbergen scheint. In einer Lage von Myosin-Aktin-Filamenten ist dieses Motiv, wie erwähnt spiegelbildlich, alle 38,7 nm zu beobachten. Besteht nun die voluminösere M-Linien-orientierte Masse aus einem Doppelköpfchen eines Myosinmoleküls und repräsentiert die dünnere Masse einen Einzelkopf, dessen Partner nach Schmitz *et al.* (Schmitz *et al.*, 1996) als zusätzliche beobachtbare Dichte am Filamentschaft lokalisiert sein könnte, ergibt sich folgende Rechnung: ein „double-chevron“ repräsentiert vier Moleküle, von denen $\frac{3}{4}$ der Köpfchen-Masse Aktin-gebunden ist. Wenn alle "target"-Zonen im Umkreis um ein Myosin-Filament besetzt sind (kontinuierliches Auftreten von „double-chevrons“) ergeben sich 36 Moleküle Myosin pro 116 nm eines Filaments, und damit mehr als eine Vierstrang-Anordnung mit 8 Ebenen beinhaltet. Dabei erfasst die Rechnung noch keine unsystematisch verteilten Köpfchen, da diese von den Mittlungsmethoden zur Darstellung von *flared X's* und „double-chevrons“ nicht rekonstruiert werden.

In tomographischen Bildern werden tatsächlich auch einige unvollständige Chevron-Formationen gefunden (Schmitz *et al.*, 1996). Eine endgültig schlüssige Auszählung scheint

schwerlich möglich; die Diskussion um nicht präservierte Querbrücken ist so alt wie die um die Köpfchenzahl pro Level (Squire, 1972). So sind die Beobachtungen an Längsschnitten auch nur mühsam konsistent mit biochemischen Ergebnissen zur Anzahl angehefteter Köpfchen im Rigor-Zustand, nach denen zwischen 20 und 30 % (Goody *et al.*, 1985; Lovell & Harrington, 1981; Thomas *et al.*, 1983) ungebunden sind. Lovell *et al.* (1981) führen aus, dass ihre Zahlen dann mit 6 Molekülen pro 14,5 nm-Ebene kompatibel sind, wenn beide Arme des Y in *flared-X*-Konfigurationen einem separaten Molekül zuzuschreiben sind. Nach Reedy (1985) sind die Querbrücken eines Y groß genug, um jeweils zwei Köpfchen repräsentieren zu können. Modellierungen von S1-Köpfchenstrukturen nach Rayment *et al.* (1993) in rekonstruierten Rigor-Formationen (Winkler *et al.*, 1996) bestätigen diese Vermutung. Damit wären in Querschnitten die Köpfchen sämtlicher Moleküle einer putativen N=4 Helix sichtbar an Aktin gebunden, und die Fraktion ungebundener Köpfchen würde somit eine Kopf/Krone-Zahl von >4 erfordern; wiederum sind hier unregelmäßig angeheftete Dichten noch nicht berücksichtigt. Die Elektronenmikroskopie kann also eine Köpfchenzahl von N=6 nicht kategorisch ausschließen.

Die Frage nach der Anzahl N von Köpfchen pro Krone des Insektenfilaments ist in einer Reihe von Untersuchungen angegangen worden und historisch betrachtet entwickelte sich speziell im Falle von *Lethocerus* ein Trend von der Zahl 6 bis hin zu 4. Frühe biochemische Ergebnisse (Chaplain & Tregear, 1966) hatten eine Anzahl von 6 Myosinmolekülen / 14,5 nm ergeben, bei einer statistischen Wahrscheinlichkeit von <1 % für 2 oder 4. Unter anderem auf dieser Grundlage und gestützt durch eigene Untersuchungen (Tregear & Squire, 1973) gelingt es Squire, das Zustandekommen von *flared-X*'s auf der Basis einer sechssträngigen Helix zu modellieren (Squire, 1972). Dieser Wert wird von Reedy und Mitarbeitern 1973 unter Verwendung quantitativ-mikroskopischer Techniken bei Myofibrillen verschiedener Insekten – *Lethocerus* eingeschlossen – recht exakt bestätigt (Reedy *et al.*, 1973).

Geluntersuchungen deuteten zeitnah auf 5 Myosine pro Krone (Bullard *et al.*, 1973). Wray wiederum konnte durch vergleichende Beugungsstudien an verschiedenen Invertebraten-Muskeln sehr stimmig eine 4-Strängigkeit für den asynchronen Muskel herleiten (Wray, 1979b). Dies gelingt ihm durch vergleichende Indizierung von Röntgenbeugungsmustern (helikale Beugung) und der gleichzeitigen Beobachtung von 4 nm dicken Rückgratstrukturen. Kombiniert mit der Berechnung, dass eine sechsfach-symmetrische Anordnung die Köpfchendichten außerhalb des Aktin-Gehäuses platzieren würde (Wray, 1982), sind dies überzeugende und seither unangefochtene Argumente gegen eine Sechs-Strängigkeit und – geht man von homogener Rotationssymmetrie aus – damit auch gegen N=6.

In der Folge wurden mit anderen Methoden (Elektronen-Streuung im STEM) Myosin/Krone-Werte zwischen 4,1 (*Musca*) und 4,4 (*Lethocerus*) an isolierten Filamenten bestimmt (Reedy *et al.*, 1981). Dem Einwand präparativer Degeneration beispielsweise durch die dort verwen-

dete Protease (CAF) wurde durch einen Vergleich mit Kaninchen-Filamenten vorgebeugt. Das Vorgehen setzt allerdings vergleichbare Feinstruktur insbesondere der besonders exponierten Köpfchen voraus. Levine (Levine, 1997) kann im direkten Vergleich zeigen, dass gerade diese beiden Filamenttypen im isolierten Zustand eine substantiell unterschiedliche Köpfchenassoziation aufweisen, wobei das *Lethocerus*-Filament sich in dieser Hinsicht auch im Vergleich zu anderen Nicht-Vertebraten-Filamenten (Levine *et al.*, 1984) distinkt verhält. Schwache Myosin-Reflexionen in den Beugungen asynchroner Muskeln waren als Zeichen von Querbrücken-Unordnung interpretiert worden (Miller & Tregear, 1972). 6 oder 4 - die offensichtliche Differenz bei ein und demselben Objekt wurde mit zusätzlicher, nicht filamentärer Proteinmasse erklärt (Reedy & Lucaveche, 1984).

Die Ergebnisse sind leider auch an anderer Stelle nicht endgültig erhellend. Densitometrische Messungen in SDS-Gelen ergeben für die Flugmuskeln von *Phormia* und *Musca* N-Werte von 5,9 bzw. 6,0 (Beinbrech *et al.*, 1985). Dieser Wert reduziert sich im Fall von *Phormia* nach Beinbrech (1985) dann auf 4,5, wenn man Arthrin (Bullard *et al.*, 1985), ein Ubiquitin-markiertes Aktin (Ball *et al.*, 1987) als systematischen, integralen Bestandteil von Aktinfilamenten in die Kalkulationen einbezieht. Eigene vorläufige Untersuchungen (nicht dargestellt) zu diesem Problem ergaben Hinweise darauf, dass das Arthrin/Aktin-Verhältnis in verschiedenen Fliegenmuskeln (*Sarcophaga*, *Musca*, *Phormia*, *Drosophila*) nicht identisch ist. Ähnliche Untersuchungen an Bienenmuskeln ergeben jedoch auch ohne Berücksichtigung zusätzlicher Aktin-Filament-Komponenten 3,82 Myosinmoleküle pro 14,5 nm (Hinkel-Aust *et al.*, 1990). Bienen könnten auch in anderer Hinsicht einen Sonderfall darstellen. Es scheint nicht sicher, ob die Aktin-Filamente in allen Bindungszuständen unveränderte Rotationsausrichtung besitzen: Helikaler "target"-Zonen-Anordnung im Rigor (Trombitas *et al.*, 1988a; Trombitas *et al.*, 1988b) und schwach gebundenen Zustand (Reedy *et al.*, 1993) stehen auf der Grundlage der Z-Scheibenstruktur (Deatherage *et al.*, 1989) Anzeichen dafür entgegen, dass diese im erschlafften Zustand ringförmige Muster bilden (Squire, 1992).

Ungeachtet dieses ungelösten Problems sollten gerade die letzteren Beobachtungen Anlass sein, eine Allgemeingültigkeit des vorgestellten Modells speziell im Hinblick auf die Schlüsselzahl N der Molekülzahl pro Köpfchenebene für asynchrone Filamente zu überdenken: Die Widersprüchlichkeit in der Literatur lässt letztlich keine eindeutige Tendenz erkennen. Einerseits konnte dargelegt werden, dass die auf der Grundlage der vorgestellten Untersuchungen an Parakristallen hergeleitete Anzahl und Anordnung von 6 Myosinmolekülen pro Level eine sinnvolle Größe darstellt, die mit vielen Beobachtungen – biochemischen wie strukturellen - in Einklang steht. Der entscheidende neue Aspekt des Filamentmodells (I oder II) ist die Vereinbarkeit von sechs Molekülen und 4-Strängigkeit. Andererseits könnten die *Apis* bzw. *Phormia*-Ergebnisse derselben Methode im selben Arbeitskreis ein Indiz dafür sein, dass

eine Abwandlung, möglicherweise im Zusammenhang mit einer Spezialisierung, in Betracht gezogen werden muss.

Das vorgestellte Muster könnte quasi eine Maximalanordnung darstellen, die innerhalb der Gruppe asynchroner Insekten-Muskeln gewebe- oder artspezifisch durch Beteiligung anderer *coiled coil*-Proteine modifiziert wird; diese könnten einzelne LMM-Segmente im nativen Filament ersetzen. In diesem Fall müssten nicht notwendigerweise 6 Myosinmoleküle respektive Querbrücken pro Krone resultieren. Zu denken ist dabei in erster Linie an Paramyosin und im Speziellen an Miniparamyosin (Becker *et al.*, 1992), das sich mit seinem Molekulargewicht von 55 kDa hervorragend dazu eignen würde, ein Molekül der beschriebenen Formation zu ersetzen. Als gemeinsames Produkt eines Gens (Maroto *et al.*, 1995) haben beide Proteine im Fall von *Drosophila* hohe Sequenzhomologie zum LMM (Vinos *et al.*, 1992). Insbesondere die für das Interaktionsverhalten des Myosins essentielle „Assembly Competent Domain“ (Sohn *et al.*, 1997) findet sich in ähnlicher Weise in der Paramyosin-Sequenz (Cohen & Parry, 1998). In *Drosophila* ist die kleinere Paramyosin-Variante in Myosinfilamenten des IFM jedoch nur lokal begrenzt nachweisbar (Maroto *et al.*, 1996). Eine mögliche Funktion von Paramyosin/Miniparamyosin für die Filament-Modelle wird unten noch näher beleuchtet. Seit kurzem eröffnen sich aber noch weitere Kandidaten: Ein sogenanntes „Mysin Rod Protein“, ebenfalls ein Produkt des einzigen Muskel-MHC-Gens von *Drosophila*, wird von einem internen Promotor abgelesen, ihm fehlt die Motor-Domäne und es wird in teilweise großen Mengen in direkten Flugmuskeln exprimiert (Standiford *et al.*, 1997). Diese und ähnliche Proteine könnten muskelspezifisch einzelne LMM-Moleküle in der vorgeschlagenen Anordnung ersetzen und damit die Köpfchen-Zahl N reduzieren.

4.4.4.3 Köpfchenmuster

Im Hinblick auf Anzahl und Anordnung von Querbrücken wurde ein Reißbrettexperiment zur weiteren Evaluierung des Filamentmodells vorgenommen: In *Lethocerus* bilden die Myosinköpfchen isolierter Filamente ausgeprägte Kronen, die nicht wie in anderen Organismen überwiegend helikale Dichteformationen (s. Abb. 1-3 D), sondern sockelartige Kränze im Abstand von 14,5 nm bilden. Eine systematische Assoziation der Köpfchen untereinander führt dazu, dass diese Kränze wiederkehrende Profile mit einer Periode von 116 nm ausbilden. Diese acht Motive, gebildet aus jeweils sämtlichen Köpfchen eines Levels, konnten Morris und Mitarbeiter aus optischen Beugungen filtern (Morris *et al.*, 1991): Abb. 4-9 A . Sie sind allesamt spiegelsymmetrisch, was in erster Linie zeigt, dass mindestens eine zweifache Rotationssymmetrie vorliegt. In Übereinstimmung mit diesem elektronenmikroskopischen Erscheinungsbild konnte Levine (Levine, 1997) zeigen, dass die Köpfchen innerhalb einer Krone quervernetzbar sind, indem die beiden Domänen eines Moleküls seitlich entgegengesetzt mit einem Einzelköpfchen des Nachbarmoleküls zusammentreffen. Dabei formen sie eine Art Hantel mit geringfügiger Neigung relativ zum Filamentquerschnitt. In Anlehnung an

Abb. 4-8 wurden derartige Hanteln auf die Gitterpunkte einer symmetrisch viersträngigen Anordnung (Abb. 4-8 A) und die der Modelle I und II (Abb. 4-8 D und E) modelliert. Der Umriss der Hantel, speziell die seitliche Ausdehnung wurde mit ca. 13 nm so gewählt, dass eine Art Halbprofilansicht eines 20 nm langen Kopfes (Ader, 1990) entsteht. Die Gitterpunkte wurden auf einen Radius von 16 nm vom Filamentzentrum extrapoliert. Ähnliche Modellierungen wurden von Morris *et al.* (1991) mit einem Massezentrum von ca. 13 nm vom Filamentkern durchgeführt. Die Autoren zitieren dort eigene Intensitäts-Analysen an anderweitig veröffentlichten Röntgenbeugungen von *Lethocerus*-Muskeln (Menetret *et al.*, 1990; Miller & Tregear, 1972; Reedy *et al.*, 1983), nach denen sich unter der Annahme einer Vierfach-Symmetrie die Massezentren der Myosinköpfchen zwischen 11 und 20 nm vom Mittelpunkt befinden.

Die Modellierung beinhaltet keine Tiefe, sondern ist lediglich eine flächige Projektion und Überlagerung von Vorder- und Rückseite der Modell-Filamente. Die Modelle sind insofern aufeinander abgestimmt, als die Vier-Start-Helices, die ja in allen vorhanden sind, zur Deckung gebracht wurden. Die gewählte Darstellung kann nur eine sehr grobe Näherung sein und erhebt keinen Anspruch auf eine naturgetreue Wiedergabe. Zu diesem Zweck müssten umfangreiche 3-dimensionale Modellierungen von S1-Strukturen (Rayment *et al.*, 1993) erfolgen. Die Ergebnisse in Abb. 4-9 zeigen aber, dass derartige Anstrengungen durchaus vielversprechend sein können:

Alle Modelle ergeben 8 spiegelbildliche Motive und einzelne Profile sind durchaus als nahe verwandt zu den nativen einzustufen: auf- bzw. abwärts geneigte Flanken von eher länglichen Mustern und gedrungeneren bis deutlich Hantel („dumbell“)-artige Formationen entstehen. Eine weitere Gemeinsamkeit besteht darin, dass sich jeweils zwei 58 nm voneinander entfernte Level in gedanklicher Superposition zu einer nahezu uniformen Dichte addieren. Das heißt, hier ergänzen sich systematisch kompakte und gestreckte Strukturen. Eine besonders ausgeprägte Entsprechung im *Lethocerus*-Filament stellt die Kombination „dumbell-flying saucer“ dar.

Die Modell-Muster (Abb. 4-9 C und D) sind in einigen Punkten einander ähnlich und entsprechen z.B. in der Abwärtsorientierung der Flanken der „seagull“- und der Aufwärtsorientierung der „stuka“-Formationen den gefilterten *Lethocerus*-Profilen. Einzelne Muster weichen jedoch modellspezifisch in Einzelheiten voneinander und dem nativen Vorbild ab. Die Modelle I und II können die quer zur Filamentachse verlaufende Symmetrie der Muster „dumbell“ und „flying saucer“ besser als die Wray-Anordnung darstellen. Insbesondere Modell I (Abb. 4-9 C) kann durch die auch in der Original-Rekonstruktion zu erkennende große Ähnlichkeit der „rowlock“-Muster und der Formationen „stuka B“ und „mexican hat“ überzeugen:

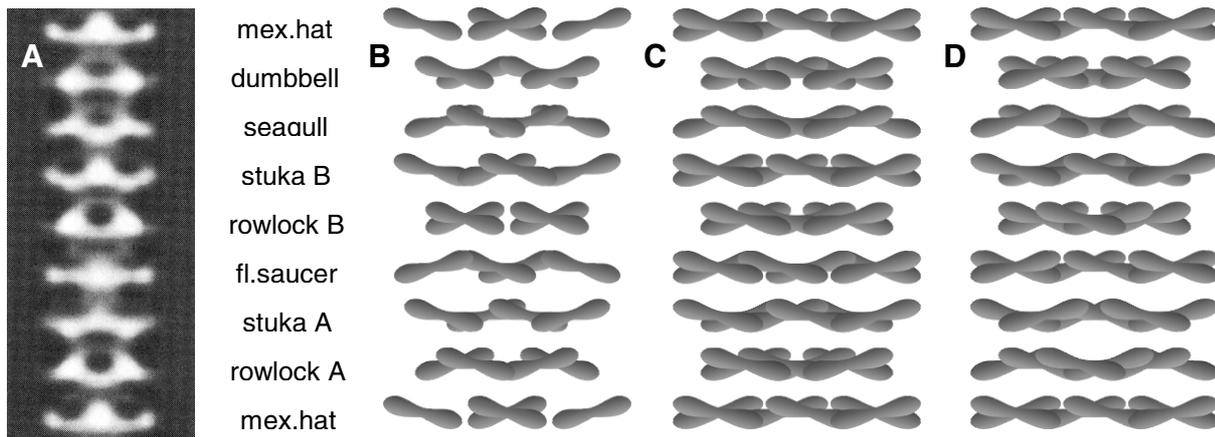


Abb. 4-9: Köpfchen-Muster nativer Filamente und verschiedener Filament-Modelle

Anordnung (flächige Projektion) von seitlich gespreizten Köpfchen-Paaren nach Levine (1997) auf Molekülpositionen verschiedener Modelle. Darstellung von 9 Köpfchen-Levels; die Positionen wurden auf einen Radius von 16 nm vom Filamentkern extrapoliert (s. Text); Vergleich mit Köpfchendichte-Rekonstruktion aus Morris *et al.* (1991)

A: Köpfchendichte-Rekonstruktion aus Morris *et al.* (1991) und deren Benennung der Levels

B: Positionen des 4fach-symmetrischen Modells nach Wray

C: Positionen des Modells I (vgl. Abb. 4-8 D)

D: Positionen des Modells II (vgl. Abb. 4-8 E)

Die Modelle I und II erweisen sich also in punkto Anzahl und Anordnung der Molekülpositionen als mindestens ebenso gut geeignet, die Köpfchenmuster auf nativen *Lethocerus*-Filamenten zu generieren, wie das Modell nach Wray.

4.4.4.4 **Backbone-Struktur**

Die Frage nach der Anzahl von Molekülen in der Anordnung führt im nächsten Schritt ins Feindetail des vorgeschlagenen Supercoils. Nach Wray's Beobachtungen von 4 nm äquatorialen Reflexionen in Beugungsbildern verschiedenster Invertebraten (Wray, 1979b) und der Zuordnung zu den Schäften dicker Filamente sollte ein Modell zu deren Aufbau diese Strukturinformation erklären können. Die Anwesenheit eines korrespondierenden Feindetails mindestens in einigen beschriebenen Objekten konnte auf der Basis von Einzelreflexen postuliert werden (vgl. Kap. 4.1.1 und 4.3.4). In einer Darstellung des Rückgrates eines Einzelfilaments der vorgeschlagenen Anordnung sollte ersichtlich sein, wie ein äquatorialer Abstand von 4 nm entstehen kann. Der Vergleich von Abb. 4-10 A und C zeigt, dass auch bei nur tendenziell achsenparallelem Verlauf von Subfilamenten im hier hergeleiteten Subfilament-Modell dieser Abstand eine deutliche Modulation des Filamentrückgrates bewirkt:

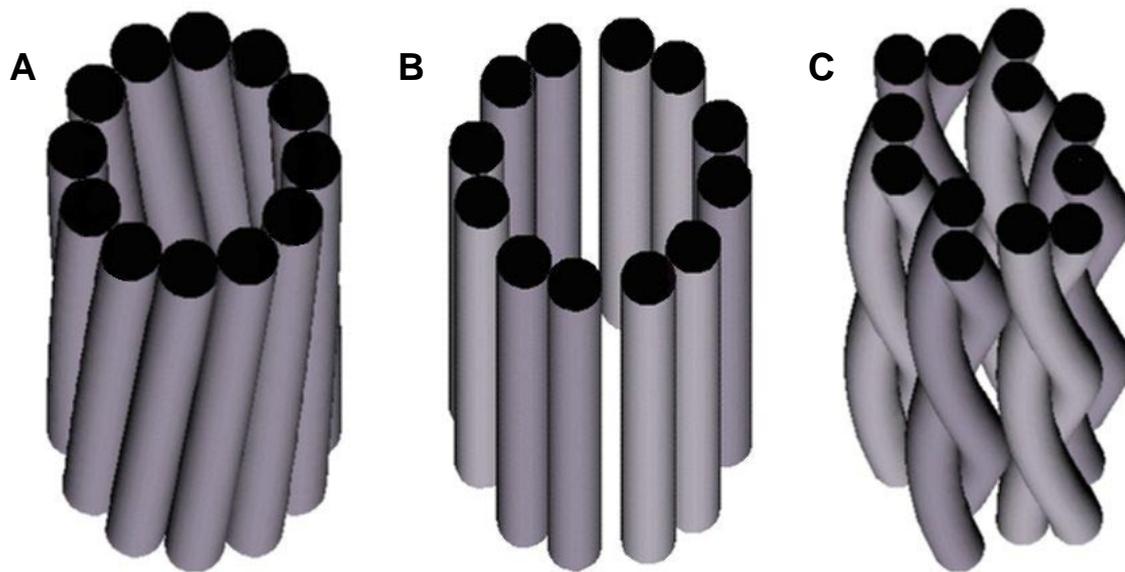


Abb. 4-10: Backbone-Modelle; 3-D-Darstellung von 116 nm-Abschnitten

A: Backbone-Modell nach Wray; Kippung der Subfilamente: $1,8^\circ$

B: Achsenparallele Subfilament-Paare nach Beinbrech

C: In der vorliegenden Arbeit abgeleitetes Subfilament-Modell mit gewundene Strang-Paaren in enger Packung nach Longley

Tatsächlich kann von einer entsprechenden Beugung auch in der kristallinen Form, bedingt durch die Windung, keine scharfe Fokussierung erwartet werden; Wray charakterisiert die entsprechenden Reflexionen als diffus. Theoretisch-mathematisch beschreibt Crick das Auftreten einer relativ intensiven, aber breiten äquatornahen Intensität eines *coiled coils* aus originären α -Helices bei 1 nm (Crick, 1953a), also dem Durchmesser eines Partners – im vorliegenden Fall würde das 4 nm entsprechen. Gewundene, 4 nm dicke Stränge innerhalb eines Subfilaments sind dementsprechend durchaus vereinbar mit Wray's Beobachtungen, wenn nicht sogar eine passable Erklärung. Im Grunde genommen wird dabei der Gedanke Wray's eines zusätzlichen Supercoiling von Strängen um die Filamenthülle lediglich übertragen auf das Supercoiling der gleichen Strukturen zum Subfilament. Das Konzept geneigter Subfilamente konnte, wie mehrfach ausgeführt, für den IFM nicht bestätigt werden. Statt dessen finden sich achsenparallel Subfilamentpaare (Abb. 4-10 B).

Bleibt zu klären, ob und ggf. wie das Modell (Abb. 4-10 C) das Erscheinungsbild gemittelter Subfilamente (Abb. 4-10 B) des IFM impliziert. Gemeinsam ist den Darstellungen nicht nur die Bündelung von Strängen zu paarigen Subfilamenten, sondern insbesondere deren achsenparallele Ausrichtung. Im Gegensatz zu den Mittelungen sind die 12 Stränge des hier

entwickelten Modells jedoch nicht konzentrisch um den Filamentmittelpunkt angeordnet. Eine solche Formation mit unterschiedlichen Orientierungen von Querschnittsachsen eines Paares kann aber von rotationssymmetrischen Filterungen nicht erfasst werden: einzelne Elemente werden unausweichlich im Umfang eines Kreises positioniert. In den Rekonstruktionen speziell der hohlen Filamente von *Musca* und *Phormia* (Beinbrech *et al.*, 1988) weisen alle Paare einen Abstand von 6,8 nm zueinander auf, exakt der Abstand, den vier von sechs Paaren in der Longley-Anordnung auch zeigen.

Zwei Intersubfilament-Abstände im vorgestellten Modell unterscheiden sich jedoch mit 8 nm hiervon. Sie geben dem Querschnitt eine leichte Polarisierung, die je nach Schnittebene mehr oder weniger deutlich ist (s. Abb. 4-7 C) und in der Überlagerung ein relativ schwaches Strukturmerkmal darstellt. Jede Filterung, die eine 2fach-Symmetrie nicht einschließt, kann diesen Effekt nicht darstellen. Filterungen auf die 6fach-Symmetrie ordnen 6 Elemente gleichmäßig um den Filamentmittelpunkt, und der zwangsläufig uniforme Abstand sollte in Richtung der Größe mit höchster Frequenz tendieren. Eine zusätzliche Spiegelebene zu berücksichtigen hieße jedoch, die Ausrichtung des Ovals im Sarkomer zu kennen, um die korrekte Deckung der benutzten Einzelfilamente zu erzeugen. Da die Drehorientierung dicker Filamente mindestens im erschlafften Zustand weitestgehend unsystematisch scheint, ist dies in solchen Präparaten kaum möglich. Selbst unter der Voraussetzung, dass im Rigor drei verschiedene Rotationspositionen existieren, macht deren unregelmäßige Verteilung im Sarkomer die Möglichkeit einer zweifelsfreien Bestimmung dieser Symmetrieachse zunichte. Lediglich optische Vorklassifizierung ist denkbar, könnte sich jedoch aufgrund der schwachen Elliptizität (s. Abb. 4-7 C) als schwierig erweisen. Trotz dieser Komplikationen existiert bereits, wie oben schon erwähnt, eine Rekonstruktion ohne Filterung auf die 6fach-Symmetrie, die nicht rotationsäquivalente Positionen von 6 Subfilamenten wie im hier abgeleiteten Modell darstellt (Schmitz *et al.*, 1994b).

Dass die Zweiteilung der darstellbaren Proteindichten eines Paares (Abb. 4-10 B) trotz Rotation der Partner umeinander erhalten bleiben kann, ist vermutlich auf die Färbungstiefe zurückzuführen. Exakt eine komplette Windung eines Supercoils müsste durchgefärbt sein, um die Mittelung eines Paares des Rückgrat-Modells in Abb. 4-10 C rund erscheinen zu lassen. Jede Abweichung der Färbungstiefe und/oder der Schnittdicke von diesem Betrag führt in der Überlagerung zu einer Polarisierung des Querschnitts durch ein Subfilament. Das Modell ist also nicht nur mit den Beobachtungen von Wray konsistent sondern, auch mit den Darstellungen von Proteindichten im Querschnitt von dicken Filamenten des IFM.

Von den Vorstellungen Squires schließlich bleiben im Modell nicht nur die 6 Moleküle pro Köpfchenkrone erhalten. Vielmehr ist noch ein weiterer wichtiger Aspekt seiner bevorzugten Zusammenlagerung von Myosinmolekülen im „curved-crystalline-layer“-Modell implementiert: die Möglichkeit eines systematischen Verlaufs der Stäbe von der Innenseite der Filament-

wand in Richtung Oberfläche des Filamentkörpers. Squire betont, dass jedes Modell, das eine solche Möglichkeit nicht bietet, enorme Schwierigkeiten hat, Molekülstäben aus dem Inneren des Filaments die Möglichkeit zu geben, ihre Köpfchen an der Oberfläche zu präsentieren (Squire, 1973).

Auch ohne die exakte Position und Orientierung von Einzelmolekülen innerhalb der 4 nm-Struktur herleiten zu können oder zu wollen, stellen sich grundsätzliche Fragen zur Verteilung der Proteindichten im nativen Filament, wenn das Modell korrekt ist. Dazu sei noch einmal ins Bewusstsein gerufen, dass die Ableitungen aus Objekten des Fragments 2-19 gemacht wurden, das mit 62,5 nm modelliert worden war. Es war für dieses Fragment eine essentiell zwei-adrige Anordnung vorgeschlagen worden, in der sich Überlappungsbereiche im Abstand von 58 nm wiederholen (Kap. 4.4.1). Schon hier ergeben sich Bereiche von 4,5 nm, die nicht mehr in einen strikt zweigeteilten Verlauf integrierbar sind. Allgemein wird nun davon ausgegangen, dass das gesamte LMM, von dem dieses Fragment nur ca. $\frac{2}{3}$ repräsentiert, im Filamentschaft integriert ist. Wo verbliebe also das restliche Drittel?

Eigene geometrische Modellierungen ergaben, dass ein Tubus von 4 nm Durchmesser in der Tat 3 *coiled coils* beherbergen kann, wenn sie entsprechend zueinander orientiert sind. Auch Wray geht davon aus, dass entsprechender Raum zur Verfügung steht (Wray, 1979b). Grundsätzlich könnten sich also alle LMM-Anteile innerhalb der vorgeschlagenen Substrukturen aufhalten. Der gesamte Schaft eines in Longley-Konfiguration aufgebauten Filaments (Abb. 4-10 C) hat einen mittleren Außendurchmesser (d) von 17,8 nm: er ergibt sich aus der Abstands-Summe der Mittelpunkte von Strang-Paaren ($4 * 6,83 \text{ nm} + 2 * 8 \text{ nm} = \pi * d$) zuzüglich zwei halber Element-Durchmesser ($2 * 2 \text{ nm}$) und liegt damit noch deutlich unterhalb dem anderer Modelle (Wray: 19,3 nm; Squire: $> 19 \text{ nm}$ (Squire, 1973)). Reedy gibt den in Querschnitten zu messenden Durchmesser mit einer Spanne (!) von 15-20 nm mit peak bei 17 nm an (Reedy, 1968). Der mittlere Radius der 4 nm dicken Proteinhülle des Modells liegt mit 13,8 nm ausreichend weit innerhalb der mit 16 nm methodisch gesetzten Grenzen der Querschnitts-Filterungen von Beinbrech *et al.* (1988), so dass auch hier kein Konflikt besteht. Es ist jedoch fraglich, ob eine vollständige Integration physiologisch sinnvoll wäre: Es würde bedeuten, dass die für das Anheften der Köpfchen essentielle flexible *hinge*-Region des Moleküls nicht systematisch an der Oberfläche des Filament-Rückgrates positioniert ist. Wenn sich aber *hinge*-nahe LMM-Anteile nicht integrieren würden, sei es aufgrund eigener Eigenschaften wie verminderter Ladungskomplementarität oder forciert und gerichtet durch Bindung an akzessorische Proteine wie Paramyosin, so könnte die flexible *hinge*-Domäne außerhalb des vorgeschlagenen Verbundes lokalisiert werden. Anzeichen für solche Mechanismen konnten im Rahmen dieser Arbeit gefunden werden. Sie werden im folgenden Kapitel besprochen.

4.5 Struktur und Funktion: Domänen des *Drosophila*-LMM

4.5.1 C-terminale zwei Drittel des Insekten-LMM

4.5.1.1 Insektenspezifische Zusammenlagerung

Das wohl überraschendste Ergebnis der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aggregationsversuche ist die Ausbildung eines insektenspezifischen 116 nm-Musters durch Fragmente, die den C-terminalen zwei Dritteln einer MHC-Isoform entsprechen. Lange Zeit war fraglich, ob und ggf. wie der Phasenunterschied zwischen Aktin-Helix (38,7nm) und Myosin-Köpfchenabständen ($n \cdot 14,5 \text{ nm}$) *in vivo* über das Zusammentreffen in einer gemeinsamen Periode von 116 nm hinaus aufeinander abgestimmt sein könnte. Für die Zunahme der 38,7 nm-Intensität in Beugungsbildern von kontrahierten Muskeln konnte zunächst eine Ausrichtung aphasisch angeordneter Köpfchen an der umgebenden Aktin-Helix verantwortlich gemacht werden - angesichts der extremen Effizienz des IFM jedoch eine unbefriedigende Vorstellung.

Solange keine detaillierte Information zur Ultrastruktur des Myosin-*backbones* zur Verfügung stand, konnte man Köpfchen-Modelle formulieren, die diesen „off-beat“ innerhalb eines Aktin-Käfigs durch spezifische Ausrichtung von Molekülen innerhalb des Myosinfilaments teilweise harmonisierten (Wray, 1979a). Zwar entsprechen Anzahl und Händigkeit der Köpfchen-Helices auf isolierten Bienenfilamenten (Trombitas & Tigyi-Sebes, 1986) nicht diesen Vorhersagen, jedoch zeigen diese deutlich eine 38,7 nm-Periodizität. Köpfchen-Ebenen von 14,5 nm und Helices im axialen Abstand von 38,7 nm scheinen besonders bei achsenparalleler Ausrichtung von Einzelmolekülen nicht ohne weiteres kompatibel. Solange vollständige Filamente untersucht werden, können jederzeit akzessorische Proteine herangezogen werden, um die Ausbildung spezieller Köpfchen-Muster und -Orientierungen zu generieren. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen nicht nur, dass die insektenspezifische 38,7 nm-periodische helikale Anordnung von Molekülen eine intrinsische Eigenschaft des Myosinmoleküls darstellt, sondern sie lokalisieren diese Funktion zusätzlich in einem ca. 400 ASe umfassenden C-terminalen Bereich. Sie demonstrieren, dass die helikalen Charakteristiken auf der Grundlage einer axialen Periode des Köpfchen-Abstandes von 14,5 nm und ohne Beteiligung von Hilfsproteinen entstehen können. Wie dies sogar mit optimierter Anpassung an die umgebende Aktin-Matrix geschehen kann, ist ausführlich in den letzten Kapiteln dargelegt worden.

Die spezifische Ausprägung der Struktur dicker Filamente ist also sehr wesentlich durch sogar lokal einzugrenzende Bereiche innerhalb des Myosinstabes prädeterminiert. Die taxonomische Spezifität zeigt sich durch den Vergleich mit Paralleluntersuchungen der Pepe-Gruppe an Vertebraten-LMM: Sequenzanaloge Fragmente einer embryonalen humanen

Myosin-Isoform zeigen differierende Aggregationsmuster (Chowrashi *et al.*, 1996). In entsprechenden Parakristallen können 72,5 – und 87 nm-Segmente (Werte angeglichen) definiert werden, die in ebenfalls polarer Abfolge angeordnet sind. Ein direkter Vergleich der ebenfalls sehr kompliziert erscheinenden Bänderungsmuster ist jedoch ohne entsprechende Beugungen sehr schwierig. Zudem ist in diesem Fall die Zugabe von Mg-ATP nötig, um hochgeordnete Aggregate zu produzieren. Letztlich sollten sich derartig differenzierte Charakteristiken auf die artspezifische Sequenzabfolge zurückführen lassen. Dabei können die Unterschiede sehr subtil sein.

Die hier vorgestellte insektenspezifische Abfolge von Molekülen innerhalb eines Modell-Stranges beinhaltet sowohl Interaktionen von 14,5 nm als auch solche von 43,5 nm. 43,5 nm-Dimere (Davis *et al.*, 1982) sind Haupt-Bestandteile der Modelle zur Zusammenlagerung von Molekülen in Vertebraten-Anordnungen. Erst sekundär sollen diese über 14,5 nm-Versetzungen miteinander in Wechselwirkung treten (Davis, 1988). Im vorgestellten Strang-Modell überwiegen direkte 14,5 nm-Interaktionen im Verhältnis 2:1 über 43,5 nm-Partner. 14,5 nm-Dimere wurden schon direkt bei *Dictyostelium* beobachtet (Pasternak *et al.*, 1989). In der Summe ist aber auch in den hier abgeleiteten Modellen eine vollständige Besetzung aller Levels innerhalb eines Subfilamentes gegeben; auch hier finden sich also – wie in Modellen des Vertebraten-Subfilaments - auf engstem Raum Moleküle, die eine kontinuierliche Abfolge im 14,5 nm-System bilden. Es sei aber noch einmal auf die interessante Konsequenz verwiesen, dass dafür nur 8 Moleküle benötigt werden im Gegensatz zu 9 Molekülen bei ausschließlich 43,5 nm-Primärversetzungen: Das Vertebraten-Filament hat eine Helix-Periode von $9 \cdot 14,5$ nm, das Insekten-Filament eine von $8 \cdot 14,5$ nm. Als eine attraktive Möglichkeit, Voraussagen über bevorzugte Interaktionen zu testen, böten sich detaillierte Sequenzanalysen an, wie sie von McLachlan und Karn (McLachlan & Karn, 1982) an *C.elegans* durchgeführt wurden. Die einzelnen, den Vielfachen von 14,5 nm entsprechenden Interaktionspeaks könnten sich artspezifisch voneinander unterscheiden und so Hinweise auf verstärkte Wahrscheinlichkeit einer 14,5 nm-Versetzung bei Insekten-Sequenzen im C-terminalen Bereich ergeben.

4.5.1.2 Struktur

Das Modell für die Organisation der letzten beiden LMM-Drittel zumindest in 116 nm-periodischen Aggregaten beinhaltet ein ausgeprägtes Supercoiling einzelner Moleküle. Über die Modellvorstellungen hinaus hatte es im Rahmen der vorgestellten Ergebnisse indirekte Hinweise auf eine Tendenz zur Windung von Molekülen gegeben (s. Abb. 3-27: Flächenanordnung mit Tendenz zur Aufrollung). Das liegt vor allem daran, dass in einer Multikomponenten-Formation eine unvollständige Windung gleichbedeutend mit einer gestörten axialen Ausrichtung sein muss, entsprechende Objekte also potentiell als unperiodisch und damit nicht klassifizierbar erscheinen. Lockig gedrehte, aperiodische Aggregate waren tatsächlich in

einigen Präparationen beobachtet worden (nicht dargestellt), jedoch konnte zwischen Denaturierungsartefakt und einer spezifischen Eigenschaft nicht unterschieden werden.

Anders im Fall von Vertebraten-LMM der Vergleichsuntersuchungen im Labor Pepe: Aggregate des C-terminalen Drittels (MHC1) zeigen – ohne Anzeichen einer 14,5 nm-verwandten Feinstruktur – ausgesprochen schraubenartige Verwindungen unterschiedlichster Gewindeperiode. Für letztere spielt nicht nur die Anzahl der Ladungen am C-Terminus, sondern auch die Ionenzusammensetzung der Lösung eine Rolle (Chowrashi *et al.*, 1996). Entsprechende Fragmente des Insekten-LMM wurden von Ziegler im eigenen Arbeitskreis untersucht. Sie bilden im Gegensatz zu HE („human embryonic“)-Myosin spezifisch gebänderte Aggregate, deren Perioden jedoch in Abhängigkeit von der Lösung – insbesondere der ATP-Zugabe – variieren (Ziegler *et al.*, 1999). Ein mehr oder weniger fortgeschrittenes *coiling* einzelner Moleküle umeinander könnte diesen Effekt erklären. Bedingt durch die begrenzte Länge dieser Moleküle ist keine Zusammenlagerung nach den hier abgeleiteten Mustern möglich; einfachere Anordnungen, die nicht einer 3-dimensionalen Matrix bedürfen, könnten eher ein unvollständiges *coiling* tolerieren, ohne dabei die periodische Bänderung einzubüßen. Ganz in diesem Sinne verkleinert sich dabei die beobachtete Periode in MHC1-Aggregaten von 43,5 nm (möglicherweise einer vergleichsweise ungewundenen Struktur) hin zu geringeren Abständen. Die Tendenz zu einem Supercoiling könnte also schon in diesem Molekülteil veranlagt sein, wie auch von Pepe vorgeschlagen.

Diese Ergebnisse werfen jedoch eine weiterreichende Frage auf: Wie kann die Myosinspezifische Grundperiode der Zusammenlagerung auch bei extensivem Supercoiling bei längeren Fragmenten erhalten bleiben? Dieses Problem wurde schon im Grundsatz von McLachlan und Karn (McLachlan & Karn, 1983) angegangen: Die von Ihnen formulierten Mikrofilamente von umeinander gewundenen *Coiled coils* lassen nur dann eine Interaktion in Multiplen von 14,5 nm untereinander zu, wenn der *pitch* des *coiled coils* einen entsprechenden Wert von 98 Å annimmt. Ein Problem, das dabei aufkommt, ist der Umstand, dass mit einem uniformen *pitch* dieser Länge rein geometrisch keine engste Packung paralleler Moleküle, z.B. in der oft zitierten „knobs-into-hole“-Weise (tetragonal) unter gleichzeitiger Beibehaltung des Gedankens der Ladungskomplementierung entstehen kann. Elektronenoptische Bilder von *coiled coil*-Proteinkristallen legen jedoch nahe, dass eine derartige Orientierung zweier Dimere zueinander möglich ist (Bullough & Tulloch, 1990; Quinlan & Stewart, 1987). Der Konflikt lässt sich lösen, wenn *coiled coils* sich nicht geometrisch ideal verhalten; in kristallinen Umgebungen wäre eine gegenseitige Induktion und Stabilisierung lokaler Konformationen, ein „induced fit“ denkbar. Geschieht dies in hoch gewundenen Zusammenlagerungen unvollständig oder suboptimal, so ist auch die Ausbildung des Supergitters gestört; die Entstehung der beobachteten lockig erscheinenden, scheinbar nicht periodischen Aggregate wäre eine mögliche Folge.

McLachlan und Karn ziehen die Skip-Reste, die das 7 ASe-Grundmuster unterbrechen, zur Erklärung von Konformationsvariationen heran und lassen schon allein auf dieser Grundlage eine mindestens 14 %ige Änderung der mittleren *pitch*-Länge des *coiled coils* zu. Skip-Reste werden als generelle Modulatoren der *coiled coil*-Geometrie diskutiert (Seo & Cohen, 1993) und können auch in direkten Zusammenhang mit lokalen Konformationsabweichungen des Myosinstabes gebracht werden (Offer, 1990).

Freilich wird das Problem des Ladungsabgleichs zwischen LMM-Molekülen durch jedes übergeordnete *coiling* vergrößert. Andererseits müssen sich nicht notwendigerweise alle Wechselwirkungen zwischen LMM-Nachbarn in einfacher Weise auf das 28 ASe-Motiv der Primärstruktur zurückführen lassen: Über die verschiedenen Hierarchie-Ebenen, angefangen beim *coiled coil-pitch* über die Orientierung der Moleküle im Strang bis hin zum *pitch* des Supercoils, können Subfilamente ein peripheres Ladungsmuster präsentieren, das ohne Kenntnis jeder einzelnen Variablen nicht direkt hergeleitet werden kann. Nahe liegend scheint lediglich durch die allgegenwärtige Präsenz der 14,5 nm-Grundperiode, dass diese Parameter in wechselseitiger Abhängigkeit stehen sollten. Als Beispiel sei hier nochmals das Modell von McLachlan und Karn angeführt, das auf einer ersten Ebene Einzelmoleküle verwendet und bei einem Supercoil-*pitch* von 58 nm einen optimalen Ladungsabgleich von benachbarten Supercoils bei einer Versetzung von 29 nm herleitet (McLachlan & Karn, 1983).

Eine gewisse, auch lokale Flexibilität bzw. Variabilität der *coiled coil*-Struktur erscheint als eine wünschenswerte, wenn nicht unbedingte Voraussetzung speziell für Modelle, die mehrere Ebenen des Supercoilings beinhalten. Dass Myosinstäbe sich nicht wie starre Gebilde verhalten, ist seit langem bekannt (Elliott & Offer, 1978; Highsmith *et al.*, 1977). Auch kleinere Abschnitte wie die Fragmente von ca. 45 kDa zeigen sich sehr flexibel (Abb. 3-9). Computer-Simulationen belegen weit darüber hinaus einen sehr großen Bereich von möglichen lokalen *itches* (11-22 nm) in Abhängigkeit von den hydrophoben Kern-Asen innerhalb des *coiled coils* (Offer & Sessions, 1995). Ausgleichsbereiche, die komplementäre Oberflächen-Ladungen lokal aufeinander abstimmen, könnten damit also durchaus durch einzelne 7 ASe-Sequenzen begünstigt werden.

Schon originäre α -Helices verhalten sich strukturell nicht nur Sequenz- sondern auch Lösungsmittel-abhängig uneinheitlich (Blundell *et al.*, 1983). Die Vorstellung, dass *coiled coils* in so regelmäßiger Struktur vorliegen, wie dies schematische Darstellungen in vereinfachter Form implizieren, ist inzwischen durch Befunde insbesondere an Tropomyosin (Phillips *et al.*, 1986) hinfällig. Die bislang hochauflösendste Kristallstruktur dieses *coiled coil*-Modellproteins zeigt Unregelmäßigkeiten im *pitch*, variable Krümmung der Partner und veränderlichen Radius des Faltungsmotivs (Whitby & Phillips, 2000). Das Bild des *coiled coils* entwickelt sich zunehmend zu dem eines vielseitigen, ja dynamischen Strukturelements (Burkhard *et al.*, 2001). Intermolekulare (zwischen Helices eines Dimers) Salzbrücken stabilisieren das *coiled*

coil (Spek *et al.*, 1998) und dirigieren die Dimerisierung (Moll *et al.*, 2000), sind aber damit gleichzeitig dem Einfluss äußerer modifizierender Faktoren wie pH und Salzkonzentration ausgesetzt (Krylov *et al.*, 1998). Die Struktur von Tripel-Helices kann sich pH-abhängig komplett auflösen, eine wichtige Voraussetzung für die biologische Funktion des Makrophagen-„Scavenger“-Rezeptors (Suzuki *et al.*, 1997) und des Oberflächenproteins Hämagglutinin des Grippe-Virus (Bullough *et al.*, 1994).

Eigene Ergebnisse zu unterschiedlichen Stablängen-Populationen bei *Phormia*-Myosin (Ader, 1990) finden zumindest auf der Grundlage der genetische Ausstattung von *Drosophila* keine bislang beschriebene Isoform-Entsprechung. Konformations-Isomere könnten eine Erklärung sein, wobei über die Einflussfaktoren nur spekuliert werden könnte. Für die Annahme, dass *coiled coil*-Strukturen auch bei gegebener Primärstruktur nicht statisch sein müssen, lassen sich weitere Indizien finden: Die eingangs beschriebenen Peptide aus LC2-defizientem Hühnchen-Myosin (Chowrashi *et al.*, 1996) können nicht durch Verdauung aus intaktem Myosin gewonnen werden; die proteolytisch angreifbare Domäne entsteht erst nach Entfernung der Leichten Kette am Kopfende. Dieses Phänomen verlangt mindestens eine lokale Umorganisation, was die Frage aufwirft, wie das Signal transduziert wurde. Umgekehrt verursacht eine Verkürzung des *coiled coil*-Stabes des Myosinmoleküls aus glatter Muskulatur (auf immerhin noch 27 nm) einen Verlust der regulatorischen Eigenschaften (Trybus, 1994), die in der Nackenregion mit den Leichten Ketten assoziiert sind. Punktmutationen in der Kopf-Domäne bei Patienten mit Cardiomyopathie bewirken veränderte Aggregationseigenschaften, die mit dem LMM assoziiert sind (Straceski *et al.*, 1994).

Anzeichen einer strukturellen Auflockerung im Bereich der letzten $\frac{2}{3}$ des LMM relativ zum N-terminalen Rest sind hier durch die CD-Messungen gegeben. Sie könnten eine zentrale Rolle bei der spezifischen – hier insektenspezifischen - Ausbildung von gewundenen Superstrukturen spielen. Denaturierungsstudien könnten die sich hier andeutende strukturelle Uneinheitlichkeit entlang des Insekten-LMM verifizieren. Entsprechende Untersuchungen zeigen im Kaninchen-Pendant tatsächlich zwei Domänen unterschiedlicher Stabilität, von denen eine auf das N-terminale Drittel diesseits 17,5 nm von der *hinge*-Region beschränkt ist (Zhou *et al.*, 1998). Karpfen-LMM verhält sich ähnlich (Nakaya *et al.*, 1997), wobei hier interessanterweise zwei Akklimatisierungs-abhängige Isoformen exprimiert werden, deren Thermostabilität trotz 95,6 %iger Sequenzhomologie deutlich verschieden ist.

4.5.1.3 Phosphorylierung

Im Hinblick auf die Strukturhomogenität offensichtlich unterschiedlich verhält sich Nicht-Muskel-Myosin aus *Acanthamoeba*, welches in einem einzigen Übergang denaturiert (Zolkiewski *et al.*, 1997), hier aber zur Erwähnung kommen soll, weil es den Gedanken der Kommunikation zwischen entfernten Molekülteilen zu unterstützen scheint: Die Autoren se-

hen in diesem kooperativen Strukturverhalten einen möglichen Kopplungsmechanismus, der regulatorische Signale am C-terminalen, 27 Ase langen, nicht helikalen Molekülende auf die Kopfdomäne überträgt. In Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus von Serin-Resten in diesem distalen Teil ändert sich die Konformation innerhalb des Myosinkopfes, und ATP-Bindung ans aktive Zentrum beeinflusst umgekehrt die Struktur des Stabes (Redowicz *et al.*, 1994). Auch wird diese Phosphorylierung in Zusammenhang mit geänderten Konformationszuständen der entsprechenden Minifilamente gebracht (Korn *et al.*, 1988; Redowicz *et al.*, 1999), welche ihrerseits eine Rolle innerhalb des ATPase-Zyklus spielen könnten (Collins & Korn, 1980). Beide Formen, phosphoryliert und dephosphoryliert, sind also (Mini-) Filament-gebunden und unterscheiden sich folglich hinsichtlich ihrer Löslichkeitseigenschaften nicht (Sinard & Pollard, 1989).

Dieser Regulationsmechanismus scheint sich damit grundlegend von anderen Phosphorylierungseffekten bei Nicht-Muskel- und Glattmuskel-Myosinen zu unterscheiden: Phosphorylierung der Leichten Ketten (RLC) induzieren hier unterschiedliche Faltungszustände des Myosinmonomers, die nur in der gestreckten (phosphorylierten) Form in der Lage sind, zu Filamenten zu aggregieren (Craig *et al.*, 1983; Katoh & Morita, 1996). Ein verwandter Regulationsmechanismus der Aggregationskontrolle scheint bei der Amöbe *Dictyostelium* zu existieren. Auch hier werden die Moleküle durch Rückfaltung an der Integration in Filamente gehindert. Allerdings ist in diesem Fall die phosphorylierte Form die lösliche (Kuczmarski *et al.*, 1987), wobei es sich bei den modifizierten Resten um 3 Threonine im Stabteil des Myosinmoleküls handelt (Luck Vielmetter *et al.*, 1990; Vaillancourt *et al.*, 1988). Diese sind im Gegensatz zu den phosphorylierbaren Aminosäuren bei *Acanthamoeba* in der α -helikalen Region lokalisiert. Ein Beispiel für Phosphorylierbarkeit sowohl von Resten innerhalb der *coiled coil*-Domänen als auch von solchen im nicht helikalen Teil stellen die Schweren Ketten von Nicht-Muskel-Myosinen in Vertebraten dar (Moussavi *et al.*, 1993). Hier finden sich Protein-kinase C-Zielsequenzen in ersteren (Conti *et al.*, 1991), Casein-Kinase II-"Targets" in letzteren Abschnitten (Murakami *et al.*, 1990). Analoge Casein-Kinase- Phosphorylierungsstellen finden sich auch in bestimmten Glattmuskel-Isoformen (Kelley & Adelstein, 1990). Die Rolle der *in vitro* nachgewiesenen Phosphorylierung von MHCs des schräg gestreiften *Caenorhabditis* -Muskels, die nur im löslichen Zustand modifizierbar sind, ist unklar (Dey *et al.*, 1992). In quergestreiften Vertebraten-Muskeln der Ratte konnten jedoch keine Phosphorylierungen innerhalb der Schweren Ketten gefunden werden (Leger *et al.*, 1980).

Gerade aufgrund dieser letzten Vorabinformation ist der dargestellte Befund einer Phosphorylierbarkeit von *coiled coil*-Sequenzen im *Drosophila*-Stab umso unerwarteter. Ursprünglich angelegt, um der Frage nachzugehen, ob die durch Exon 19 kodierte Domäne an einer potentiellen Protein-Kinase C-Stelle phosphoryliert werden kann, zeigen die Experimente eine Modifizierbarkeit von Resten diesseits des Helix-brechenden Prolins in dem kurzen Abschnitt

von 5 Aminosäuren, die die Fragmente 2-1 und 2-18 voneinander unterscheidet. Im hier zu erfassenden quantitativen Rahmen können keinerlei signifikante Unterschiede der *in vitro*-Phosphorylierbarkeit zwischen den vier verschiedenen kurzen Fragmenten festgestellt werden.

Die Versuche waren so angelegt, dass eine physiologische Relevanz für das Filament möglichst direkt abgeleitet werden kann. Initiiert wurden sie durch den *in situ*-Befund, dass Schwere Ketten im Gegensatz zu anderen quergestreiften Muskeln in phosphorylierter Form vorliegen können (Abb. 3-15). Bei diesen Experimenten wurde versucht, die myofibrilläre Herkunft der phosphorylierten Spezies durch die Vorreinigungs-Prozedur sicher zu stellen. Zwar kann eine Verunreinigung durch lösliche Proteine wie zum Beispiel gefaltete Myosin-Monomere nicht ausgeschlossen werden, jedoch scheint das Ausmaß der Markierung zu weitgehend, als dass eine verunreinigende lösliche Population dafür verantwortlich gemacht werden könnte. Damit könnte es sich bei der Schwere Kette von *Drosophila* um die erste ihrer Art handeln, die in quergestreiften Muskeln phosphoryliert vorliegen kann; darüber hinaus scheint diese modifizierte Form ein integraler Bestandteil dicker Filamente sein zu können.

Diese ersten Ergebnisse schienen die Arbeitshypothese zu bekräftigen, nach der ein C-terminaler Serin-Rest möglicherweise Ziel einer Phosphorylierung sein könnte. Um auch für die anschließenden *in vitro*-Experimente an den kleineren der Fragmente möglichst zellnahe Bedingungen für die durchgeführten Orientierungsversuche zu gewährleisten, wurden verschiedene Muskelextrakte anstelle von käuflichen Enzympräparationen verwendet (Kuczmarski *et al.*, 1987). Der direkte Vergleich der Exon19-Mutante mit seinem unmutierten Pendant konnte die Hypothese nicht mehr stützen, kann sie jedoch als Negativ-Ergebnis auch nicht widerlegen. Statt dessen konnte eine Phosphorylierbarkeit innerhalb des α -helikalen Teils demonstriert werden. Dabei scheinen unterschiedliche Kinasen befähigt zu sein, diese Modifikation/en durchzuführen: eine cytosolische Form und eine sehr stark myofibrillär gebundene, die erst unter Verwendung von Ionenstärken, die das dicke Filament vollständig auflösen, maximal extrahierbar ist. Letztere scheint sich durch ihre enge Verbundenheit mit dem myofibrillären Apparat von der Kinase-Aktivität in dicken Filamenten von *Caenorhabditis* zu unterscheiden, die nur locker assoziiert ist (Dey *et al.*, 1992).

Da das Auftreten der C-terminal unterschiedlichen MHC-Isoformen an unterschiedliche Entwicklungsstadien gebunden ist, schien es aufgrund der Hypothese folgerichtig, Präparationen unterschiedlicher Entwicklungsstadien zu verwenden. In Larven- wie in Adult-Muskel-Extrakten kann Kinase-Aktivität an den kleineren Fragmenten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu einer möglichen Alles-oder-Nichts-Reaktion sind die erzielten Ergebnisse jedoch quantitativ schwer zu vergleichen, da es aufgrund des Fehlens einer vergleichbaren myofibrillären Struktur keinen offensichtlichen gemeinsamen Bezugspunkt gibt. Selbst der

Bezug auf die Menge an Schwere Kette innerhalb der myofibrillären Extrakte scheint daher nicht angebracht. Auch ohne diesen direkten quantitativen Bezug kann jedoch gefolgert werden, dass das Auftreten dieser Kinasen zumindest nicht auf bestimmte Stadien beschränkt ist – nachdem keine Verbindung zu den unterschiedlichen C-Termini aufgestellt werden konnte, keine Überraschung mehr. Damit erscheint aber auch ein möglicher Zusammenhang von Phosphorylierung und spezifischer Struktur und Funktion des IFM fraglich, wenn auch nicht ausgeschlossen.

Gleichwohl konnten strukturelle Veränderungen in Parakristallen von phosphorylierten und nicht phosphorylierten Fragmenten beobachtet werden. Angesichts der Lokalisation im aggregationsfähigen *coiled coil*-Abschnitt liegt die Vermutung nahe, dass Modifikationen des Ladungsmusters einen Einfluss auf die Zusammenlagerung der Moleküle haben sollten. So werden auch die oben zitierten Phosphorylierungen anderer Myosine in diesem Bereich im Zusammenhang mit Formation und Stabilität von Filamenten gesehen (Moussavi *et al.*, 1993). Neben einer Änderung des Gesamterscheinungsbildes – die Parakristalle phosphorylierter Fragmente zeigen einen durchweg ebenmäßigeren Aufbau und sind besonders nach Behandlung mit cytosolischen Proteinen endwärts gefranst (Abb. 3-17) – ist in den Transformaten eine Verminderung der off-meridionalen Intensitäten zu verzeichnen, während sich die 14,5 nm verwandten Ordnungen auf dem Meridian intensivieren. Beide Tendenzen signalisieren eine Umorganisation bzw. eine im Vergleich zur Kontrolle abgewandelte Feinstruktur in Parakristallen phosphorylierter Fragmente. Diese Versuche stehen noch am Anfang und können als erste Schritte zunächst lediglich einen qualitativen Effekt demonstrieren. In Kombination mit den *in situ*-Ergebnissen eröffnen sie jedoch ein völlig neues Feld für weitere Untersuchungen zu diesem bei quergestreiften Muskeln bislang nicht beschriebenen Phänomen.

Über eine etwaige Funktion eines solchen Regulationsmechanismus lassen sich in Ermangelung weiterführender Untersuchungen nur sehr spekulative Vermutungen anstellen. Die Parakristalle scheinen immerhin anzudeuten, dass die modifizierten Fragmente ihre Aggregationsfähigkeit nicht verloren haben, was vorläufig durchaus mit der Annahme harmoniert, dass auch die phosphorylierten Schwere Ketten der metabolischen Markierung aus dem myofibrillären Apparat stammen. Eine Lokalisation potentiell physiologisch relevanter Phosphorylierungsstellen, gerade in diesem für die spezifische Zusammenlagerung offensichtlich entscheidend mitverantwortlichen Teil, scheint aber in besonderer Weise interessant. Falls sich bestätigt, dass die molekulare Organisation – möglicherweise sehr geringfügig – durch Phosphorylierung variiert werden kann, so würde dies den oben abgeleiteten Modellen einen zusätzlichen dynamischen Faktor verleihen. Strukturell unterschiedliche Zustände des Rückgrates sollten auch die Feinanordnung der Köpfchen beeinflussen. Durchaus denkbar ist, dass die in Abb. 4-9 dargestellten Köpfchenmuster, die ja lediglich als Annäherung zu ver-

stehen sind, einen mehr oder auch weniger optimalen Zustand darstellen, den zu induzieren oder modifizieren es weiterer Signale bedarf.

4.5.1.4 Molekülabstände

Diese Überlegungen leiten über zu abschließenden Betrachtungen der bevorzugten molekularen Organisation der Fragmente, die annähernd den letzten $\frac{2}{3}$ des *Drosophila*-LMM's entsprechen. Ein Wert, der bislang undiskutiert geblieben ist, ist der mit dem Fragment 2-18 auf Lipidflächen beobachtete Abstand von 2,95 nm senkrecht zur 14,5 nm-Periode (Abb. 3-26 A). Es handelt sich um eine Größe im Bereich von Molekülabständen, für die kein Präzedenzfall in der Literatur zu *coiled coil*-Anordnungen gefunden werden konnte. Da gleiches für die abgeleiteten Subfilament-Modelle gilt und der Wert sich hinreichend nahe am Abstand von gemittelten Proteindichten aus Insektenfilament-Querschnitten (2,8 nm) (Beinbrech *et al.*, 1988) befindet, scheint die Annahme naheliegend, dass es sich hierbei um einen spezifischen und signifikanten Abstand handelt. Er ist als 4. Ordnung von 11,8 nm denkbar und stünde damit möglicherweise im Zusammenhang zur Anordnung von 4 nm dicken Subfilamenten nach Longley, die einen Abstand von 11,1 nm vorhersagt. Der Abstand von 2,8 nm in nativen Filamenten war schon oben analog interpretiert worden.

Wie in Kap. 4.3.2 beschrieben stellen antiparallele Komponenten einen wesentlichen Baustein der Monolayer-Formationen dar. Diese Reflexion kann also durch eine Verwandtschaft mit dem 11,2 nm-Abstand andeuten, dass auch an dieser Anordnung Subfilamente nach dem in Abb. 4-1 dargestellten Prinzip von gewundenen, 4 nm dicken Strängen beteiligt sind. Die Ausbildung einer im Sinne der Longley-Packung vollständigen Anordnung setzt beträchtliche Tiefe des Objekts voraus und ist darum in diesen Präparaten unwahrscheinlich. So ist auch das Auftreten einer 11,2 nm-Reflexion hier nicht zu erwarten. Vielmehr könnten nur bestimmte Teilaspekte der Organisation aus Abb. 4-1 B, wie z.B. einzelne Schichten, vorhanden sein.

Das würde bedeuten, dass sich antiparallele Moleküle ohne grundsätzliche Änderung der Strang-Organisation integrieren könnten. Im Filament ergibt sich im M-Linien-Bereich die Notwendigkeit antiparalleler Aggregation. Auch das Aggregat in Abb. 3-30 A könnte durch die Anwesenheit einer Spiegelebene, die dem Verhalten im Bereich der M-Linie entspricht, diese Interpretation unterstützen. Die für die Zusammenlagerung im Bereich der M-Linie entscheidenden antiparallelen Wechselwirkungen würden dann die übergeordnete Struktur nicht wesentlich ändern – eine wichtige Voraussetzung für das Auftreten ovaler Querschnitt-Profile auch im Bereich der zentralen *bare zone* dicker Insektenfilamente (Freundlich & Squire, 1983).

Auch in Layeranordnungen N-terminal längerer Fragmente konnten laterale Separationen im Bereich von Molekülabständen beobachtet werden. Der Einfluss des N-terminalen LMM-Drittels soll Gegenstand des nächsten Kapitels sein.

4.5.2 N-terminales Drittel des Insekten-LMM

4.5.2.1 Einfluss auf Aggregate

Wenngleich die Superposition der Moleküle zu einem grundsätzlich mindestens ähnlichen bis kaum unterscheidbaren Ergebnis bei der flächigen Anordnung von Fragment 2-18 und dem N-terminal längeren Fragment 3-1 führt (vgl. Abb. 3-26 A und B), so muss sich jedoch die molekulare Organisation substantiell unterscheiden: starke äquatoriale Reflexionen markieren hier einen Abstand von 3,8 nm. Im Gegensatz zu einer Reflexion bei ca. 2,9 nm finden sich hierzu einige Parallelen in der Literatur. Es handelt sich um Beispiele von Stabfragmenten des Vertebraten-Myosins.

Die Arbeit von Bennett zeigt äquatoriale Beugungswolken bei 3,5 nm in 43,5 nm-periodischen Parakristallen (Bennett, 1981). Yagi und Offer entwickeln detailliertere Modelle zur Einheitszelle dieses Typs von Aggregaten und korrigieren den Wert auf der Basis von Röntgenbeugungen auf 3,9 nm (Yagi & Offer, 1981). Diese Separation gibt Raum für 2 Moleküle, deren exakte Dreh-Orientierung zueinander nicht zu bestimmen ist, wenn nicht andere Symmetriefaktoren mit einfließen: Tubus-artige Aggregate aus S2-Molekülen weisen ebenfalls einen Einheitszellenabstand von 3,9 nm auf (Quinlan & Stewart, 1987); jedoch finden sich in diesem Fall Reflexionen nur auf der 2. Ordnung, also dem Molekülabstand von 1,95 nm. Die Autoren führen dies auf eine „knobs-into-hole“-Geometrie der seitlichen Assoziation zurück, die als engste Packung einer molekularen Versetzung von $\frac{1}{4}$ *pitch* entspricht (Abb. 4-1 A); diese lässt eine Gleitsymmetrie innerhalb der Einheitszelle entstehen, die ungerade Ordnungen verbietet. Mit dieser Packung kann der seitliche Abstand von Molekülpaaren je nach Radius des originären coils bis hinunter zu 3,4 nm (entsprechend $r = 0,5$ nm) und darunter variieren. Der relativ hohe Betrag von 3,8 nm – wegen möglicher Schrumpfung eher noch am unteren Rand der tatsächlichen Verhältnisse – und das Fehlen einer Gleitsymmetrie kann im Fall des Fragments 3-1 auf Lipidoberflächen eine engste Packung ausschließen. Eine direkte Packungsverwandtschaft scheint hingegen mit dem Arrangement in 43,5 nm-Parakristallen von Vertebraten-LMM zu bestehen. Vergleichbare, aber nicht identisch aufgebaute Parakristalle (s. Kap. 4.3.1) mit dieser Periodizität konnten ausschließlich mit dem Fragment 3-19 erhalten werden. Packung und Periodizität scheinen sich also in Anwesenheit des N-terminalen LMM-Drittels in Richtung Vertebraten-ähnlicher Charakteristiken zu verändern.

Nach den Modellvorschlägen zur insektenspezifischen Anordnung der kürzeren Fragmente in zwei Adern innerhalb eines Stranges wäre es eine durchaus folgerichtige Konsequenz, dass die Anwesenheit des MHC3-Abschnitts die Ausbildung der Subfilament-Struktur in Abb. 4-10 C nicht zulässt. Zwar böte ein Strangdurchmesser von 4 nm theoretisch genug Raum für 3 Moleküle im Querschnitt, jedoch wird es von der exakten Packung der Moleküle, die bislang nicht hergeleitet werden kann, abhängen, ob das zusätzliche Drittel integrierbar ist. Dies scheint nicht der Fall zu sein: Weder 116 nm-periodische Strukturen noch Anzeichen einer Longley-Packung konnten mit den längeren Fragmenten beobachtet werden.

Für das Filament würde dies bedeuten, dass der MHC3-Abschnitt aus dem durch MHC2-C gebildeten Kern des Rückgrates herausgehalten werden muss. An dieser Stelle könnten akzessorische Proteine, an erster Stelle Paramyosin, ins Spiel kommen, dessen Interaktion mit den exprimierten Fragmenten Gegenstand weiterer Untersuchungen war:

4.5.2.2 Paramyosin-Bindung

Die funktionelle Integrität des hier von *Acherontia* präparierten Paramyosins konnte durch die Darstellung hochgradig homogener Parakristalle mit einer Paramyosin-spezifischen Periode von 72,5 nm demonstriert werden (Abb. 3-20). Die Ableitung eines Molekülmodells wird durch die Anwesenheit von zwei unterschiedlich großen Paramyosin-Spezies sehr erschwert und soll hier nicht weiter verfolgt werden. Bei den beiden Molekülarten sollte es sich um Isoformen handeln, da diese schon in Myofibrillenproben in exakt gleichen Mengenverhältnissen auftreten (Abb. 3-17). Zwei Paramyosin-Isoformen innerhalb eines Muskels sind für schnelle Hummer-Muskeln (Mykles, 1988) und langsame Krabben-Muskeln (Sakurai *et al.*, 1996) beschrieben. Einige Charakteristika der Zusammenlagerung sind jedoch trotz verschiedener Molekülpopulationen direkt aus den Parakristallen abzuleiten. Wie auch bei Muscheln (Matsuno *et al.*, 1996) stellt eine vermutlich parallele (Pante, 1994) Versetzung von 72,5 nm den zentralen Bestandteil der Anordnung dar; die Breite der färbungsintensivsten Lücken könnte mit einer Moleküllänge von 135 nm korreliert werden, die damit im Bereich anderer Paramyosine von 135 nm (Lowey *et al.*, 1963), 127,5 nm (Cohen *et al.*, 1971) oder 140 nm (Sakurai *et al.*, 1996) angesiedelt ist. Paramyosin-Parakristalle zeigen eine deutliche Tendenz zu positivem *staining* durch Anlagerung von Schwermetallionen, so dass die Periode artspezifisch von schwachen, dünnen Streifenmustern geprägt ist (Cohen *et al.*, 1971; Kendrick-Jones *et al.*, 1969), wie sie auch besonders in der Rekonstruktion in Abb. 3-20 festzustellen sind. Diese Muster sind hier eindeutig bipolar, die Zusammenlagerungen haben also eine antiparallele Komponente. In *Caenorhabditis*-Filamenten mit einem zentralen Kern hohen Paramyosin-Gehalts soll auch dieses Protein in Strängen organisiert sein, in denen einzelne Moleküladern um 72,5 nm gegeneinander versetzt sind (Epstein *et al.*, 1995).

Schon die Elektronenmikroskopie deutet eine bevorzugte Interaktion zwischen langen Fragmenten und Paramyosin relativ zu den kürzeren an. Mischkristalle (Abb. 3-22), die auch anhand des Beugungsbildes als Hybride zwischen 72,5 nm- und 14,5 nm-Mustern zu identifizieren sind, treten häufiger auf und sind von vergleichsweise höherer interner Regelmäßigkeit. Im Vergleich dazu sind Parakristalle von kleineren Fragmenten mit Paramyosin - von Ausnahmen abgesehen (Abb. 3-22 D) - oft schlechter geordnet bis sogar augenscheinlich aperiodisch (Abb. 3-21). Diese Befunde sind offenkundig schwerlich zu quantifizieren und können lediglich eine Tendenz anzeigen, die jedoch durch die Bindungsversuche deutlich bestätigt wird: Die jeweils längeren Fragmente ohne Mutation binden um einen durchschnittlichen Faktor von 2,5 besser an Paramyosin.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann eine Domäne innerhalb des MHC3-Abschnittes postuliert werden, die maßgeblich für die Paramyosin-Bindung des Insekten-LMM verantwortlich ist. *In vivo* kann dies bedeuten, dass primär Sequenzen dieses Abschnittes mit Paramyosin interagieren. Dies ist exakt die Forderung, die sich aus dem Modell der insekten-spezifischen Zusammenlagerung eines kurzen Fragments ergibt. Damit entstünde ein zentraler Subfilament-Kern, der sich nach dem Muster einer Longley-Packung aus zwei LMM-Dritteln konstituierte (Abb. 4-10 C), und zusätzliches LMM-Material, das über Paramyosin in der Peripherie fixiert wird und auf diese Weise den N-Terminus des LMM an der Oberfläche positioniert. Eine Studie, die auch für einen mindestens 17,5 nm umfassenden Bereich des Kaninchen-LMM's eine Nicht-Integriertheit in den Filamentkörper herleitet (Chang & Ludescher, 1994), wird kontrovers diskutiert (Zhou *et al.*, 1998).

Auch für eine solche erhöhte Affinität bestimmter Abschnitte sollten Variationen innerhalb der Primärstruktur verantwortlich sein. Hoppe und Waterston sehen einen Zusammenhang zwischen Hydrophobizitäts-Schwankungen an der Oberfläche des *coiled coils* von *Caenorhabditis*-MHC-Isoformen und deren Fähigkeit, mit Paramyosin in Wechselwirkung zu treten (Hoppe & Waterston, 1996). Zwar beziehen sich diese Analysen auf die zentral im Filament lokalisierte MHC A-Isoform, die für die Initiation der Filamentbildung zuständig sein soll (Epstein, 1988); die abgeleiteten Mechanismen könnten aber in diversen Myosinen ohne weiteres an anderen Stellen Verwendung finden. Tatsächlich erscheint die MHC3-Region im Hydrophobizitäts-Plot nach Eisenberg (Eisenberg *et al.*, 1984; Lowey *et al.*, 1963) hydrophober als der Rest des *Drosophila*-LMM (untersucht unter www.expasy.ch).

Nach diesen Vorstellungen würde Paramyosin also auch eine systematische Rolle beim Aufbau der peripheren Wandstrukturen spielen. Bestimmte nachprüfbare Bedingungen müssten dafür erfüllt sein: Es müsste sich auf der gesamten Länge des A-Bandes an dicken Filamenten nachweisen lassen. Genau dies ist im IFM von *Drosophila* und *Lethocerus* der Fall: Maroto und Kollegen können eine uniforme Verteilung von Paramyosin entlang des dicken Filaments zeigen (Maroto *et al.*, 1996). Auch für den ebenfalls quergestreiften Trochanter-

Muskel von *Drosophila* trifft dies zu (Royuela *et al.*, 1997). Mit Ausnahme des *Drosophila*-Flugmuskels verhält sich die kleinere Miniparamyosin-Form ähnlich, so dass die Paramyosin-Form voller Länge in der Tat den geeignetsten Kandidaten für die Erfüllung der postulierten Aufgaben darstellt. Die zitierten Ergebnisse können zwar letztlich nicht unzweifelhaft die Anwesenheit von Paramyosin auf der Außenseite des Filaments demonstrieren, es scheint jedoch sehr unwahrscheinlich, dass die immunologischen Nachweise Proteine im Kern der Filamente detektieren würden. Tatsächlich ist der Nachweis von Proteinen im A-Band wegen der sehr erschwerten Zugänglichkeit der Epitope aufgrund der hohen Proteindichte schon an sich ein schwieriges Unterfangen.

Eigene Untersuchungen mit mehreren monoklonalen anti-LMM-Antikörpern, die wohl die weniger proteindichte M-Linie und die Filamentenden färben, nicht aber die A-Band-Region bestätigen Beobachtungen an Vertebraten-Muskeln, die ebenfalls eine limitierte Färbung durch Anti-LMM im A-Band zeigen (Pepe, 1982). Auch frühe Versuche, Paramyosin in *Lethocerus* zu lokalisieren, konnten in ähnlicher Weise und im Gegensatz zu den oben zitierten Untersuchungen keine Färbung der Aktin-Myosin-Überlappungszonen zeigen (Bullard *et al.*, 1977b). Die Schwierigkeit, Paramyosin an dicken Filamenten nachzuweisen, werden auch von Castellani und Vibert demonstriert, die eine enge Assoziation mit Myosin-Subfilamenten aus *Mytilus* nur in aufgelockerten Zuständen dicker Filamente finden (Castellani & Vibert, 1992).

Gelingt es also, Paramyosin in Schnitten an dicken Filamenten zu detektieren, so kann dies als starkes Indiz dafür gewertet werden, dass dies kein kerngebundenes Material darstellt. Auch das Extraktionsverhalten von Paramyosin stützt die These, dass dieses außer im Kern auch in der Peripherie dicker Insektenfilamente (hier *Acherontia*; gleiches gilt für *Locusta* oder *Phormia*) lokalisiert sein könnte: Schon bei sehr geringen Ionenstärken (s. Kap. 3.6.1) ist eine nennenswerte Menge dieses Proteins in Lösung zu bringen; das Reinigungsprotokoll macht sich eben diesen Umstand zunutze. Abb. 3-17 B zeigt, wie im Vergleich zum Myofibrillen-Verhältnis von Myosin:Paramyosin unproportional viel Paramyosin unter diesen Bedingungen in Lösung zu bringen ist, ein Umstand, der nur schwer erklärbar wäre, stammte diese Fraktion allein aus dem Inneren der dicken Filamente. Das Extraktionsverhalten von Paramyosin aus *Caenorhabditis*-Filamenten zeigt ebenfalls biphasisches Verhalten (Deitiker & Epstein, 1993; Epstein, 1988).

Insektenfilamente wie die von *Musca* und *Drosophila*, die im Querschnitt hohl erscheinen, weisen einen Paramyosinanteil von ca. 3 % auf (Beinbrech *et al.*, 1985). Es könnte sich bei dieser offensichtlich essentiellen Fraktion um Moleküle handeln, die an der Oberfläche der Filamente lokalisiert sind und dort die Aufgabe der MHC3-Bindung erfüllen. Auf der Grundlage der Molekulargewichte der *Drosophila*-Primärsequenzen von Myosin und Paramyosin ergibt sich ein respektives Molekülverhältnis von ca. 12 :1. Mit einer Länge von 135 nm er-

reicht ein einzelnes Paramyosin-Molekül auf der Außenseite des hier vorgeschlagenen Subfilaments (Abb. 4-7 B) die MHC3-Regionen von sechs Myosin-Dimeren, die um 14,5 nm versetzt sind. Der Anteil von Paramyosin scheint also ausreichend, die Funktion der MHC3-Positionierung in der Peripherie des Filamentrückgrates zu erfüllen. Genau dies könnte die Aufgabe des Minimalanteils von Paramyosin im Insektenfilament darstellen und so die Ausbildung der Rückgratstruktur nach Abb. 4-10 durch den MHC2-C-Anteil möglich machen.

Die Ergebnisse zur Paramyosin-Bindung der mutierten C19-Isoform des längeren Fragments (3-19 G) zeigt darüber hinaus, dass auch weitere Sequenzen die Wechselwirkung zwischen LMM und Paramyosin beeinflussen können:

4.5.3 C-terminale Sequenzen

Ein drastischer Anstieg der Paramyosin-Bindung des Fragments 3-19 ist nach Mutation des Serin-Restes im durch Exon19 kodierten *random coil*-Abschnitt zu verzeichnen. Eine physiologische Relevanz dieser Beobachtung kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht direkt abgeleitet werden, da die Phosphorylierungs-Experimente keinen Hinweis auf eine *in vivo* vorkommende Modifizierung ergeben haben. Jedoch gibt das Zusammentreffen der Expression einer Exon19-Isoform im Larvenstadium, der Anwesenheit ausschließlich solider Filamente ebenda und der sehr stark erhöhten Paramyosin-Bindung der Mutante Anlass zu der Vermutung, dass die Phosphorylierungs-Experimente im Hinblick auf eine Modifizierung des Serin-Restes in Exon 19 nicht abschließend erschöpfend ausgefallen sind. Möglicherweise ist der Grad der Phosphorylierung anderer Reste innerhalb der untersuchten Fragmente auch so hoch, dass die angewendete Nachweis-Methode nicht in der Lage ist, eine zusätzliche Markierung zu detektieren. Auch zu diesem offenen Punkt könnten weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden.

Im Augenblick ist schwer zu sehen, wie die Einführung einer negativen Ladung das Verhalten so deutlich zu ändern in der Lage ist. Einen weiteren möglicherweise bedeutsamen Hinweis liefern die Löslichkeitsuntersuchungen: Hier hat die Mutation einen exakt entgegengesetzten Effekt: Die Löslichkeit der Mutante ist bei Fragmenten beider Größengruppen signifikant erhöht, d.h. die Wechselwirkung zwischen LMM-Molekülen ist negativ beeinflusst. Es erscheint eher unwahrscheinlich, dass die Einführung der Ladung eine eigene, neue Paramyosin-Bindungs-Domäne kreiert, da sie nach wie vor in eine *random coil*-Umgebung eingebettet ist. Die Beobachtungen könnten aber über einen übergeordneten Parameter, die Struktur des Fragments speziell unter Aggregationsbedingungen miteinander zusammenhängen.

Anhaltspunkte für einen Einfluss C-terminaler Ladungen auf die Gesamtstruktur ergeben sich auch aus den Ergebnissen der Pepe-Gruppe an Vertebraten-Myosin: Hier sind in der entsprechenden *random coil*-Domäne negative Ladungen geclustert. Je nach Anzahl dieser

Ladungen, die sukzessive deletiert wurden, ändert sich die Windungsperiode korkenzieherartiger Aggregate des kurzen MHC1-Fragments (Chowrashi *et al.*, 1996; Pepe, 1982). Die Ladungsbalance innerhalb dieser *random coil*-Domänen könnte also einen Einfluss auf die Struktur entlang des *coiled coils* haben und so die Wechselwirkung mit direkten Nachbarn beeinflussen. Dabei wäre ein gegenläufiger Effekt auf LMM-LMM- bzw. LMM-Paramyosin-Interaktionen eine durchaus sinnvoll erscheinende Konsequenz. Auch dieser Effekt würde nicht dem Alles-oder-Nichts-Prinzip gehorchen: die Mutante von 2-19 zeigt keine abgewandelte Paramyosin-Bindung, d.h. die Anwesenheit der MHC3-Domänen erscheint als eine notwendige Voraussetzung für die Paramyosin-Bindung.

Zusammenfassend muss in Bezug auf die nicht mutierten unterschiedlichen C-Termini der hier exprimierten Fragmente festgehalten werden, dass keine eindeutigen Effekte auf die untersuchten Parameter nachgewiesen werden konnten. In Bezug auf Löslichkeit, CD-Signal, Fähigkeit zu antiparalleler Zusammenlagerung, Paramyosin-Bindung oder Phosphorylierbarkeit sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expressionsprodukten einer Größengruppe festzustellen. Die Funktion des durch Exon 19 kodierten Bereichs bleibt also weiter im Unklaren. Es erscheint lediglich bemerkenswert, dass die einzige parallele Anordnung nur in Anwesenheit dieser Domäne erhalten wurde. Ebenso scheint den C-terminal letzten 5 ASen des Exon17 keine besondere Bedeutung für die hier untersuchten Eigenschaften beizukommen; dass der durch Exon 18 kodierte Isoleucin-Rest einen bedeutsamen Einfluss haben könnte, durfte *a priori* nicht angenommen werden.

Wenngleich die physiologische Relevanz einer putativen Phosphorylierung in der Exon 19-Domäne nicht gezeigt werden konnte, so zeigen die Ergebnisse, wie sensibel bestimmte Eigenschaften auf Ladungsunterschiede in diesem Bereich reagieren. Dieses Epitop könnte auch eine Rolle bei der Wechselwirkung mit anderen Myosin-assoziierten Proteinen spielen. Die hier durchgeführten Bindungsstudien haben keine Anzeichen einer Wechselwirkung von Projektin mit den untersuchten LMM-Abschnitten ergeben. LMM-Domänen sind aber offensichtlich in die Assoziation von Flightin an das dicke Filament in *Drosophila* involviert (Kronert *et al.*, 1926; Reedy *et al.*, 2000). Ein ähnliches Protein in *Lethocerus* soll an C-terminale LMM-Sequenzen binden (Ferguson *et al.*, 1994).

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, die Rolle des *Drosophila*-LMM (Light Mero Mysin) bzw. seiner einzelnen Abschnitte bei der Strukturbildung dicker Filamente aus Insektenflugmuskeln zu untersuchen. Die hier vorgestellten Ergebnisse demonstrieren, dass die artspezifische Ausprägung dicker Filamente wesentlich durch Eigenschaften der LMM-Domäne des Myosins determiniert ist. Es konnte ein Modell zur Struktur des Myosinfilaments aus Insektenflugmuskeln entwickelt werden.

Um eine gezielte Herstellung definierter Teilabschnitte des LMM zu ermöglichen, wurde zunächst ein Expressionssystem etabliert, über das acht Fragmente des Insekten-LMM in großen Quantitäten rekombinant hergestellt werden konnten. Diese Fragmente fallen in zwei Größenklassen, indem bei unterschiedlichen C-Termini die längeren fast vollständigem LMM entsprechen (z.B. 3-19), die kürzeren nahezu die C-terminalen $\frac{2}{3}$ des LMM repräsentieren (z.B. 2-19). Die Expressionseffektivität der Fragmente in *E.coli*-Zellen erreicht Niveaus bis zu 90 % des Zellproteins. Dabei werden die translatierten Proteine zumindest bei bestimmten Produkten in kristalliner Form in den Bakterien abgelagert. Die in Präparaten von 2-19 exprimierenden Zellen gefundenen Kristall-Eckdaten konnten zur Entwicklung eines Modells zur Ultrastruktur des Insektenfilaments herangezogen werden.

Die physiko-chemischen Eigenschaften der gereinigten Fragmente stehen in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten in Bezug auf Moleküllänge, α -Helixgehalt und Löslichkeit. Dabei scheinen sich die Eigenschaften der N-terminal verkürzten Fragmente geringfügig von denen der längeren zu unterscheiden. Sie weisen neben einem geringeren Helix-Anteil auch eine herabgesetzte Löslichkeit auf. Der Ladungsbilanz im nicht-helikalen C-Terminus scheint eine besondere Bedeutung für die Löslichkeit beizukommen: Die Einführung einer negativen Ladung im Exon 19 durch Mutation erhöht unabhängig vom N-Terminus der Fragmente die Löslichkeit. Die aufgeführten Abweichungen hinsichtlich der Molekülstruktur und der Löslichkeit könnten eine Voraussetzung für divergierende Aggregations-Charakteristiken längerer und kürzerer Fragmente darstellen, die sich auch in strukturell unterschiedlichen Molekülanordnungen widerspiegeln:

Flächenanordnungen auf Lipid-Monolayern zeigen, dass auch bei ähnlicher Struktur in axialer Richtung die Natur der seitlichen Zusammenlagerung kleiner und großer Fragmente in diesen Präparaten unterschiedlich ist.

Darüber hinaus bilden die längeren Fragmente 3-19 und dessen Mutante wie die Entsprechungen aus Vertebraten-LMM Parakristalle mit einer Periode von 43,5 nm. Zur Erklärung

dieses und eines 14,5 nm-periodischen Bänderungsmusters kann ein etabliertes Modell zur Molekülanordnung in Vertebraten-Parakristallen durch Einführung einer alternativen antiparallelen Überlappung modifiziert werden. Diese Abweichungen deuten auf ein unterschiedliches Assoziationsverhalten im Bereich der *bare zone* dicker Filamente aus Vertebraten- und Insektenmuskeln hin.

Im Gegensatz dazu bilden die kürzeren Fragmente in keinem Fall Aggregate mit einer Periode von 43,5 nm aus; für diese kann ein alternatives Molekülmodell zur Herleitung eines 14,5 nm-periodischen Bänderungsmusters formuliert werden. Es beinhaltet 14,5 nm versetzte Molekülpartner, die sich im Abstand von 58 nm wiederholen; diese Formation ist Bestandteil des Modells zur Anordnung von Myosinmolekülen im Filamentschaft.

Speziell das Fragment 2-19 und dessen Mutante formen – anders als ihre Vertebraten-Pendants - Parakristalle mit einer unipolaren 116 nm-Periode. Diese stellt eine Insektenflugmuskelspezifische Größe dar. Beugungsmuster der Parakristalle verhalten sich in wesentlichen Merkmalen analog zu denen isolierter Insektenfilamente. Die Information zur artspezifischen Zusammenlagerung von Insekten-LMM ist also augenscheinlich in den letzten zwei Dritteln der Domäne lokalisiert.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnte ein Filamentmodell hergeleitet werden, das teils widersprüchliche Befunde und Modelle zur Struktur des dicken Filaments aus Insektenflugmuskeln in sich vereinigt.

Zentrale Elemente des Modells stellen Subfilamente aus zwei 4 nm dicken Strängen dar. Diese Stränge winden sich in Form eines Supercoils paarweise mit einer Windungslänge von 116 nm umeinander. 6 Subfilamente ordnen sich in einer kristallinen Formation zum im Querschnitt leicht elliptischen Filamentkörper. Es können zwei mögliche Kombinationen von Subfilamenten formuliert werden, die nahezu identische Charakteristika aufweisen.

Die Modelle beinhalten 6 Moleküle pro Köpfebene eines Insektenfilaments. Diese sind in 4 Helices organisiert und können so ultrastrukturelle Untersuchungen zur helikalen Ordnung bestätigen. Die Ableitungen zeigen, dass eine 4fache Rotationssymmetrie nicht notwendigerweise 4 Myosin-Köpfchen pro Ebene bedingen muss, wie bislang angenommen. Andere publizierte helikale Eigenschaften in Form einer 2fach-symmetrischen Köpfebene, die mit der Symmetrie von Targetzonen der umgebenen Aktinfilamente kongruieren, werden in den Modellen ebenfalls generiert. Die Anordnungen ergänzen damit die „match-mismatch-Hypothese“ zur Dehnungsaktivierung des Insektenflugmuskels.

Die abgeleiteten Subfilamente beherbergen lediglich die letzten beiden Drittel des LMM. Die Bedeutung des N-terminalen Drittels wäre somit nicht primär in der Steuerung der Selbstassoziation zu suchen. Diese Bereiche könnten in die Wechselwirkung mit assoziierten Proteinen involviert sein: Die langen Fragmente nativer Sequenz, die diese LMM-Anteile beinhalten, binden um einen durchschnittlichen Faktor von 2,5 besser an Paramyosin. Diese *hing-*

nahen LMM-Bereiche könnten in peripheren Zonen des Filamentkörpers über Paramyosin fixiert sein.

Den durch alternative Exons kodierten C-Termini verschiedener LMM-Isoformen konnte keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Die in Exon 19 eingeführte Mutation zur Simulation einer Phosphorylierung steigert jedoch die Bindung des längsten der untersuchten Fragmente an Paramyosin noch weiter. Direkte Hinweise auf eine Phosphorylierung dieses spezifischen Restes durch *Drosophila*-eigene Kinasen aus Muskelextrakten konnten allerdings nicht gefunden werden.

Andererseits sind aber alle Fragmente an anderen Stellen durch Extrakte aus *Drosophila*-Myogewebe *in vitro* phosphorylierbar. Eine Phosphorylierung von Schweren Ketten des Myosins wurde auch in metabolischen Markierungen intakten Muskelgewebes von *Drosophila* gefunden. Die Bedeutung einer Phosphorylierung von LMM-Resten, die bislang für quergestreifte Muskeln nicht beschrieben ist, ist unklar. Die Auswertung der Parakristall-Struktur phosphorylierter Fragmente deutet auf eine Modifizierung ihrer Mikrostruktur hin.

6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2-D	zwei-dimensional
3-D	drei-dimensional
A. bid.	aqua bidestillata
A. dest.	aqua destillata
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
AMPPNP	Adenosin 5' [β,γ-imido] triphosphat
appar.	apparent
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASe(n)	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintri-phosphat
β-Gal	Beta-Galaktosidase
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAM	Chloramphenicol
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Circulardichroismus
d.h.	das heißt
ddATP	Didesoxyadenosintri-phosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtri-phosphat
ddTTP	Didesoxythymidintri-phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EK	Enterokinase
ELISA	„enzyme linked immuno sorbent assay“
EM	Elektronenmikroskop
Fa.	Firma

FFT	„fast Fourier transform“
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HC	„heavy chain“
HE	„human embryonic“
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HMM	„heavy mero myosin“
HMW	„high molecular weight“
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFM	Insektenflugmuskel
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
kalkul.	kalkuliert
Kap.	Kapitel
kB	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
LC	Leichte Kette des Myosins
LMM	Leichtes Meromyosin
LMP	“low melting point”
LMW	“low molecular weight”
M	Marker
MBP	“maltose binding protein”
MHC	„myosin heavy chain“
min	Minuten
MMP	Magermilch-Pulver
MRE	„mean residue ellipticity“
mRNA	Messenger-RNA
MRW	„mean residue weight“
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der Messwerte
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
o.e.	oben erwähnt
o.g.	oben genannt
OD	optische Dichte
OPD	<i>ortho</i> -Phenylendiamin
P _i	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PEG	Polyethylenglycol
pfu	„plaque forming units“
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PP _i	Pyrophosphat
R	Regressionskoeffizient
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
σ	Standardabweichung
S	Subfragment
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SDP	Standard-Verdünnungs-Prozedur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
sog.	sogenannt
SSC	Natrium-Natriumcitrat
ssDNA	Einzelstrang-DNA
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) _n
tRNA	Transfer-RNA
Tween 20	Polyoxythylensorbitan-monolaurat
u.a.	unter anderem
u.s.w.	und so weiter
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

7 Literaturverzeichnis

- Abbott, R. H. & Cage, P. E. (1984). A possible mechanism of length activation in insect fibrillar flight muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **5**, 387-397.
- Ader, G. (1990). Untersuchungen zur Struktur von Insektenmyosin. *Diplomarbeit*, WWU Münster.
- Amelinckx, S., Devouard, B. & Baronnet, A. (1996). Geometrical aspects of the diffraction space of serpentine rolled microstructures: their study by means of electron diffraction and microscopy. *Acta Crystallogr. A* **A52**, 850-878.
- Ashhurst, D. E. (1977). The Z-line: its structure and evidence for the presence of connecting filaments. In *Insect Flight Muscle* (Tregear, R. T., ed.), pp. 57-73, North Holland, Amsterdam.
- Ashton, F. T., Beinbrech, G. & Pepe, F. A. (1987). Subfilament organization in myosin filaments of the fast abdominal muscles of the lobster, *Homarus americanus*. *Tissue Cell* **19**, 51-63.
- Ashton, F. T. & Pepe, F. A. (1981). The myosin filament. VIII. Preservation of subfilament organization. *J. Microsc.* **123**, 93-104.
- Ashton, F. T., Weisel, J. & Pepe, F. A. (1992). The myosin filament XIV backbone structure. *Biophys. J.* **61**, 1513-1528.
- Atkinson, S. J. & Stewart, M. (1991a). Expression in *Escherichia coli* of fragments of the coiled-coil rod domain of rabbit myosin: influence of different regions of the molecule on aggregation and paracrystal formation. *J. Cell Sci.* **99**, 823-836.
- Atkinson, S. J. & Stewart, M. (1991b). Molecular basis of myosin assembly: coiled-coil interactions and the role of charge periodicities. *J. Cell Sci. Suppl.* **14**, 7-10.
- Ausubel, F. M. (1987). *Current protocols in molecular biology*. Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Baccetti, B. (1965). [New observations on the ultrastructure of myofilaments]. *J. Ultrastruct. Res.* **13**, 245-256.
- Ball, E., Karlik, C. C., Beall, C. J., Saville, D. L., Sparrow, J. C., Bullard, B. & Fyrberg, E. A. (1987). Arthrin, a myofibrillar protein of insect flight muscle, is an actin-ubiquitin conjugate. *Cell* **51**, 221-228.
- Becker, K. D., O'Donnell, P. T., Heitz, J. M., Vito, M. & Bernstein, S. I. (1992). Analysis of *Drosophila* paramyosin: identification of a novel isoform which is restricted to a subset of adult muscles. *J. Cell Biol.* **116**, 669-681.
- Beinbrech, G., Ashton, F. T. & Pepe, F. A. (1988). Invertebrate myosin filament: subfilament arrangement in the wall of tubular filaments of insect flight muscles. *J. Mol. Biol.* **201**, 557-565.
- Beinbrech, G., Ashton, F. T. & Pepe, F. A. (1990). Orientation of the backbone structure of myosin filaments in relaxed and rigor muscles of the housefly: evidence for non-equivalent crossbridge positions at the surface of thick filaments. *Tissue Cell* **22**, 803-810.
- Beinbrech, G., Ashton, F. T. & Pepe, F. A. (1992). The invertebrate myosin filament: subfilament arrangement of the solid filaments of insect flight muscles. *Biophys. J.* **61**, 1495-1512.

- Beinbrech, G., Meller, U. & Sasse, W. (1985). Paramyosin content and thick filament structure in insect muscles. *Cell Tissue Res.* **241**, 607-614.
- Bennett, P. M. (1981). The structure of spindle-shaped paracrystals of light meromyosin. *J. Mol. Biol.* **146**, 201-221.
- Bernstein, S. I., Hansen, C. J., Becker, K. D., Wassenberg, D. R. 2., Roche, E. S., Donady, J. J. & Emerson, C. P. J. (1986). Alternative RNA splicing generates transcripts encoding a thorax-specific isoform of *Drosophila melanogaster* myosin heavy chain. *Mol. Cell Biol.* **6**, 2511-2519.
- Blundell, T., Barlow, D., Borkakoti, N. & Thornton, J. (1983). Solvent-induced distortions and the curvature of alpha-helices. *Nature* **306**, 281-283.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Breuer, M (1982). Untersuchungen zur Funktionsweise des Flugmuskels der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria*: Der Einfluss des Paramyosins auf die ATPase-Aktivität der kontraktile Proteine *in vitro*. *Dissertation*, WWU Münster.
- Bullard, B., Bell, J., Craig, R. & Leonard, K. (1985). Arthrin: a new actin-like protein in insect flight muscle. *J. Mol. Biol.* **182**, 443-454.
- Bullard, B., Bell, J. L. & Luke, B. M. (1977a). Immunological investigation of proteins associated with thick filaments of insect flight muscle. In *Insect Flight Muscle* (Tregear, R. T., ed.), pp. 41-52, North Holland, Amsterdam.
- Bullard, B., Dabrowska, R. & Winkelman, L. (1973). The contractile and regulatory proteins of insect flight muscle. *Biochem. J.* **135**, 277-286.
- Bullard, B., Hammond, K. S. & Luke, B. M. (1977b). The site of paramyosin in insect flight muscle and the presence of an unidentified protein between myosin filaments and Z-line. *J. Mol. Biol.* **115**, 417-440.
- Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1994). Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**, 37-43.
- Bullough, P. A. & Tulloch, P. A. (1990). High-resolution spot-scan electron microscopy of microcrystals of an alpha-helical coiled-coil protein. *J. Mol. Biol.* **215**, 161-173.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. & Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* **11**, 82-88.
- Burns, C. G., Reedy, M., Heuser, J. & De-Lozanne, A. (1995). Expression of light meromyosin in *Dictyostelium* blocks normal myosin II function. *J. Cell Biol.* **130**, 605-612.
- Caspar, D. L., Cohen, C. & Longley, W. (1969). Tropomyosin: crystal structure, polymorphism and molecular interactions. *J. Mol. Biol.* **41**, 87-107.
- Castellani, L. & Vibert, P. (1992). Location of paramyosin in relation to the subfilaments within the thick filaments of scallop striated muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **13**, 174-182.
- Chang, Y. C. & Ludescher, R. D. (1994). Local conformation of rabbit skeletal myosin rod filaments probed by intrinsic tryptophan fluorescence. *Biochemistry* **33**, 2313-2321.
- Chaplain, R. A. & Tregear, R. T. (1966). The mass of myosin per cross-bridge in insect fibrillar flight muscle. *J. Mol. Biol.* **21**, 275-280.
- Chen, G. F. & Inouye, M. (1990). Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids. Res.* **18**, 1465-1473.

- Chen, Y. H., Yang, J. T. & Chau, K. H. (1974). Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **13**, 3350-3359.
- Chew, M. W. & Squire, J. M. (1995). Packing of alpha-helical coiled-coil myosin rods in vertebrate muscle thick filaments. *J. Struct. Biol.* **115**, 233-249.
- Chowrashi, P. K., Pemrick, S. M., Li, S., Yi, P., Clarke, T., Maguire, B., Ader, G., Saintigny, P., Mittal, B., Tewari, M., Stoeckert, C., Stedman, H. H., Sylvester, J. E. & Pepe, F. A. (1996). The myosin filament XV assembly: contributions of 195 residue segments of the myosin rod and the eight C-terminal residues. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **17**, 555-573.
- Chowrashi, P. K. & Pepe, F. A. (1971). Some aspects of light meromyosin aggregation. In *Proceedings of the first European Biophysics Congress* (Bonda, E. & Locker, A., eds.), pp. 429-436, H. Springer-Lederer, Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, Wien.
- Chowrashi, P. K. & Pepe, F. A. (1977). Light meromyosin paracrystal formation. *J. Cell Biol.* **74**, 136-152.
- Chowrashi, P. K. & Pepe, F. A. (1989). The myosin filament. XIII. The sensitivity of LMM assembly to Mg.ATP. *Biochim. Biophys. Acta* **997**, 182-187.
- Cline, J., Braman, J. C. & Hogrefe, H. H. (1996). PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3546-3551.
- Cochran, W., Crick, F. H. C. & Vand, V. (1952). The structure of synthetic polypeptides. I. The Fourier transform of atoms on a helix. *Acta Crystallogr.* **5**, 581-586.
- Cohen, C. (1982). Matching molecules in the catch mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 3176-3178.
- Cohen, C., Caspar, D. L., Parry, D. A. & Lucas, R. M. (1972). Tropomyosin crystal dynamics. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **36**, 205-216.
- Cohen, C. & Holmes, K. (1963). X-ray diffraction evidence for alpha-helical coiled coils in native muscle. *J. Mol. Biol.* **6**, 423-432.
- Cohen, C., Lowey, S., Harrison, R. G., Kendrick-Jones, J. & Szent-Györgyi, A. G. (1970). Segments from myosin rods. *J. Mol. Biol.* **47**, 605-609.
- Cohen, C. & Parry, D. A. D. (1998). A conserved C-terminal assembly region in paramyosin and myosin rods. *J. Struct. Biol.* **122**, 180-187.
- Cohen, C., Szent-Györgyi, A. G. & Kendrick-Jones, J. (1971). Paramyosin and the filaments of molluscan "catch" muscles. I. Paramyosin: structure and assembly. *J. Mol. Biol.* **56**, 223-227.
- Collins, J. H. & Korn, E. D. (1980). Actin activation of Ca²⁺-sensitive Mg²⁺-ATPase activity of *Acanthamoeba* myosin II is enhanced by dephosphorylation of its heavy chains. *J. Biol. Chem.* **255**, 8011-8014.
- Conti, M. A., Sellers, J. R., Adelstein, R. S. & Elzinga, M. (1991). Identification of the serine residue phosphorylated by protein kinase C in vertebrate nonmuscle myosin heavy chains. *Biochemistry* **30**, 966-970.
- Craig, R., Padron, R. & Alamo, L. (1991). Direct determination of myosin filament symmetry in scallop striated adductor muscle by rapid freezing and freeze substitution. *J. Mol. Biol.* **220**, 125-132.
- Craig, R., Smith, R. & Kendrick-Jones, J. (1983). Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules. *Nature* **302**, 436-439.
- Crick, F. H. C. (1953a). The Fourier Transform of a coiled-coil. *Acta Crystallogr.* **6**, 685-689.

- Crick, F. H. C. (1953b). The packing of alpha-helices: simple coiled coils. *Acta Crystallogr.* **6**, 689-697.
- Cross, R. A. & Vandekerckhove, J. (1986). Solubility-determining domain of smooth muscle myosin rod. *FEBS Lett.* **200**, 355-360.
- Crowther, R. A., Padron, R. & Craig, R. (1985). Arrangement of the heads of myosin in relaxed thick filaments from tarantula muscle. *J. Mol. Biol.* **184**, 429-439.
- Davis, J. S. (1988). Assembly processes in vertebrate skeletal thick filament formation. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 217-239.
- Davis, J. S., Buck, J. & Greene, E. P. (1982). The myosin dimer: an intermediate in the self-assembly of the thick filament of vertebrate skeletal muscle. *FEBS Lett.* **140**, 293-297.
- De Lozanne, A., Berlot, C. H., Leinwand, L. A. & Spudich, J. A. (1987). Expression in *Escherichia coli* of a functional Dictyostelium myosintail fragment. *J. Cell Biol.* **105**, 2999-3005.
- Deatherage, J. F., Cheng, N. Q. & Bullard, B. (1989). Arrangement of filaments and cross-links in the bee flight muscle Z disk by image analysis of oblique sections. *J. Cell Biol.* **108**, 1775-1782.
- Deitiker, P. R. & Epstein, H. F. (1993). Thick filament substructures in *Caenorhabditis elegans*: evidence for two populations of paramyosin. *J. Cell Biol.* **123**, 303-311.
- Dey, C. S., Deitiker, P. R. & Epstein, H. F. (1992). Assembly-dependent phosphorylation of myosin and paramyosin of native thick filaments in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1528-1532.
- Ebashi, S. (1972). Calcium ions and muscle contraction. *Nature* **240**, 217-218.
- Ebashi, S. (1976). Proceedings: Regulation of the myosin-actin interaction by the Ca²⁺-troponin-tropomyosin system. *J. Biochem. (Tokyo)* **79**, 48P-49P.
- Edwards, A. M., Darst, S. A., Hemming, S. A., Li, Y. & Kornberg, R. D. (1994). Epitaxial growth of protein crystals on lipid layers. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 195-197.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. & Wall, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **179**, 125-142.
- Elliott, A. & Bennett, P. M. (1984). Molecular organization of paramyosin in the core of molluscan thick filaments. *J. Mol. Biol.* **176**, 477-493.
- Elliott, A., Lowy, J., Parry, D. A. & Vibert, P. J. (1968). Puzzle of the coiled coils in the alpha-protein paramyosin. *Nature* **218**, 656-659.
- Elliott, A. & Offer, G. (1978). Shape and flexibility of the myosin molecule. *J. Mol. Biol.* **123**, 505-519.
- Epstein, H. F. (1988). Modulation of myosin assembly. *Bioessays* **9**, 197-200.
- Epstein, H. F., Aronow, B. J. & Harris, H. E. (1975). Interaction of myosin and paramyosin. *J. Supramol. Struct.* **3**, 354-360.
- Epstein, H. F., Lu, G. Y., Deitiker, P. R., Oritz, I. & Schmid, M. F. (1995). Preliminary three-dimensional model for nematode thick filament core. *J. Struct. Biol.* **115**, 163-174.
- Ferguson, C., Lakey, A., Hutchings, A., Butcher, G. W., Leonard, K. R. & Bullard, B. (1994). Cytoskeletal proteins of insect muscle: location of zeelins in *Lethocerus* flight and leg muscle. *J. Cell Sci.* **107**, 1115-1129.
- Fraser, R. D. B. & MacRae, T. P. (1973). *Conformation in fibrous proteins*. Academic Press, New York.

- Freundlich, A. & Squire, J. M. (1983). Three-dimensional structure of the insect (*Lethocerus*) flight muscle M-band. *J. Mol. Biol.* **169**, 439-453.
- Fukami, A. & Adachi, K. (1965). A new method of preparation of a self-perforated micro plastic grid and its application. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* **14**, 112-118.
- George, E. L., Ober, M. B. & Emerson, C. P. J. (1989). Functional domains of the *Drosophila melanogaster* muscle myosin heavy-chain gene are encoded by alternatively spliced exons [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1989 Sep;9(9):4118]. *Mol. Cell Biol.* **9**, 2957-2974.
- Goody, R. S., Reedy, M. C., Hofmann, W., Holmes, K. C. & Reedy, M. K. (1985). Binding of myosin subfragment 1 to glycerinated insect flight muscle in the rigor state. *Biophys. J.* **47**, 151-169.
- Gursky, Y. G. & Bibilashvili, R. (1994). The increase in gene expression induced by introduction of rare codons into the C terminus of the template. *Gene* **148**, 15-21.
- Gursky, Y. G., Marimont, N., Shevelev, A., Iuzhakov, A. & Bibilashvili, R. (1992). [Rare codons and gene expression in *Escherichia coli*]. *Mol. Biol. Mosk.* **26**, 1063-1079.
- Hammond, C. (1997). *The basics of crystallography and diffraction*. International Union of Crystallography, Chester, England.
- Harburn, G., Taylor, C. A. & Welberry, T. R. (1975). *Atlas of optical transforms*. Cornell University Press, Ithaca, N. Y.
- Harrington, W. F. & Burke, M. (1972). Geometry of the myosin dimer in high-salt media. I. Association behavior of rod segments from myosin. *Biochemistry* **11**, 1448-1455.
- Harrison, R. G., Lowey, S. & Cohen, C. (1971). Assembly of myosin. *J. Mol. Biol.* **59**, 531-535.
- Haselgrove, J. C. & Reedy, M. K. (1984). Geometrical constraints affecting crossbridge formation in insect flight muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **5**, 3-24.
- Hemming, S. A., Bochkarev, A., Darst, S. A., Kornberg, R. D., Ala, P., Yang, D. S. & Edwards, A. M. (1995). The mechanism of protein crystal growth from lipid layers. *J. Mol. Biol.* **246**, 308-316.
- Henschen, A., Lottspeich, F., Topfer-Petersen, E. & Warbinek, R. (1977). On the primary structure of fibrinogen. *Bibl. Haematol.* **44**, 106-113.
- Highsmith, S., Kretzschmar, K. M., O'Konski, C. T. & Morales, M. F. (1977). Flexibility of myosin rod, light meromyosin, and myosin subfragment-2 in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 4986-4990.
- Hinkel-Aust, S., Hinkel, P. & Beinbrech, G. (1990). Four cross-bridge strands and high paramyosin content in the myosin filaments of honeybee flight muscles. *Experientia* **46**, 872-874.
- Hoppe, P. E. & Waterston, R. H. (1996). Hydrophobicity variations along the surface of the coiled-coil rod may mediate striated muscle myosin assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **135**, 371-382.
- Huxley, H. E. (1953). Electron microscope studies of the organization of the filaments in striated muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 387-394.
- Huxley, H. E. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* **173**, 973-976.
- Huxley, H. E. (1957). The double array of filaments in cross striated muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 631-648.
- Huxley, H. E. (1963). Electron microscope studies of the structure of natural and synthetic protein filaments from muscle. *J. Mol. Biol.* **7**, 281-308.

- Huxley, H. E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science* **164**, 1356-1366.
- Ikebe, M., Hewett, T. E., Martin, A. F., Chen, M. & Hartshorne, D. J. (1991). Cleavage of a smooth muscle myosin heavy chain near its C terminus by alpha-chymotrypsin. Effect on the properties of myosin. *J. Biol. Chem.* **266**, 7030-7036.
- Kakinuma, M., Funabara, D., Nakaya, M., Hirayama, Y., Watabe, S., Maeda, K. & Ooi, T. (1997). Thermal unfolding of the cold-acclimated type of carp light meromyosin expressed by recombinant DNA in *Escherichia coli*. *Fisheries Science* **63**, 1008-1013.
- Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 494-500.
- Kane, J. F., Violand, B. N., Curran, D. F., Staten, N. R., Duffin, K. L. & Bogosian, G. (1992). Novel in-frame two codon translational hop during synthesis of bovine placental lactogen in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Nucleic. Acids. Res.* **20**, 6707-6712.
- Kato, T. & Morita, F. (1996). Roles of light chains in the activity and conformation of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* **271**, 9992-9996.
- Katsura, I. & Noda, H. (1973). Structure and polymorphism of light meromyosin aggregates. *J. Biochem. (Tokyo)* **73**, 257-268.
- Kaufmann, E., Geisler, N. & Weber, K. (1984). SDS-PAGE strongly overestimates the molecular masses of the neurofilament proteins. *FEBS Lett.* **170**, 81-84.
- Kelley, C. A. & Adelstein, R. S. (1990). The 204-kDa smooth muscle myosin heavy chain is phosphorylated in intact cells by casein kinase II on a serine near the carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* **265**, 17876-17882.
- Kendrick-Jones, J., Cohen, C., Szent-Györgyi, A. G. & Longley, W. (1969). Paramyosin: molecular length and assembly. *Science* **163**, 1196-1198.
- Kendrick-Jones, J., Szentkiralyi, E. M. & Szent-Györgyi, A. G. (1976). Regulatory light chains in myosins. *J. Mol. Biol.* **104**, 747-775.
- Kensler, R. W., Levine, R. J. & Stewart, M. (1985). Electron microscopic and optical diffraction analysis of the structure of scorpion muscle thick filaments. *J. Cell Biol.* **101**, 395-401.
- Kensler, R. W. & Stewart, M. (1986). An ultrastructural study of cross-bridge arrangement in the frog thigh muscle thick filament. *Biophys. J.* **49**, 343-351.
- King, L., Jiang, M. J., Huang, T. S. & Sheu, G. C. (1995). Protease-susceptible sites and properties of fragments of aortic smooth-muscle myosin. *Biochem. J.* **312**, 511-518.
- King, M. V. & Young, M. (1972). Evidence for flexibility of the helical rod section of the myosin molecule. *J. Mol. Biol.* **65**, 519-523.
- Klug, A. & Berger, J. E. (1964). An optical method for the analysis of periodicities in electron micrographs, and some observations on the mechanism of negative staining. *J. Mol. Biol.* **10**, 565-569.
- Klug, A., Crick, F. H. C. & Wyckoff, H. W. (1958). Diffraction by helical structures. *Acta Crystallogr.* **11**, 199-213.
- Kölsch, B., Ziegler, C. & Beinbrech, G. (1995). Length determination of synthetic thick filaments by cooperation of two myosin-associated proteins, paramyosin and projectin. *Naturwissenschaften* **82**, 239-241.
- Korn, E. D., Atkinson, M. A., Brzeska, H., Hammer, J. A. 3., Jung, G. & Lynch, T. J. (1988). Structure-function studies on *Acanthamoeba* myosins IA, IB, and II. *J. Cell Biochem.* **36**, 37-50.

- Kronert, W. A., O'Donnell, P. T., Fieck, A., Lawn, A., Vigoreaux, J. O., Sparrow, J. C. & Bernstein, S. I. (1926). Defects in the *Drosophila* myosin rod permit sarcomere assembly but cause flight muscle degeneration. *J. Mol. Biol.* **249**, 111-125.
- Krylov, D., Barchi, J. & Vinson, C. (1998). Inter-helical interactions in the leucine zipper coiled coil dimer: pH and salt dependence of coupling energy between charged amino acids. *J. Mol. Biol.* **279**, 959-972.
- Kubalek, E. W., Kornberg, R. D. & Darst, S. A. (1991). Improved transfer of two-dimensional crystals from the air/water interface to specimen support grids for high-resolution analysis by electron microscopy. *Ultramicroscopy* **35**, 295-304.
- Kuczmariski, E. R., Tafuri, S. R. & Parysek, L. M. (1987). Effect of heavy chain phosphorylation on the polymerization and structure of Dictyostelium myosin filaments. *J. Cell Biol.* **105**, 2989-2997.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D. & Zakour, R. A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**, 367-382.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, R. J., Egelhoff, T. T. & Spudich, J. A. (1994). Molecular genetic truncation analysis of filament assembly and phosphorylation domains of Dictyostelium myosin heavy chain. *J. Cell Sci.* **107**, 2875-2886.
- Leger, J. J., Klotz, C. & Preteseille, M. (1980). Absence of phosphates from the myosin heavy chains of striated muscles. *Biochimie* **62**, 803-809.
- Lehman, W. (1977). The dual system of calcium-activation in arthropod muscles. In *Insect Flight Muscle* (Tregear, R. T., ed.), pp. 277-284, North-Holland, Amsterdam.
- Lehman, W., Bullard, B. & Hammond, K. (1974). Calcium-dependent myosin from insect flight muscles. *J. Gen. Physiol.* **63**, 553-563.
- Lehman, W., Craig, R. & Vibert, P. (1994). Ca²⁺-induced tropomyosin movement in *Limulus* thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction. *Nature* **368**, 65-67.
- Levine, R. J., Kensler, R. W., Reedy, M., Hoffman, W., Davidheiser, S. & Davies, R. E. (1984). Structure of *Limulus* and other invertebrate thick filaments. *Adv. Exp. Med. Biol.* **170**, 93-106.
- Levine, R. J. C. (1997). Differences in myosin head arrangement on relaxed thick filaments from *Lethocerus* and rabbit muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **18**, 529-543.
- Liang, W. C., Warrick, H. M. & Spudich, J. A. (1999). A structural model for phosphorylation control of Dictyostelium myosin II thick filament assembly. *Journal of Cell Biology* **147**, 1039-1047.
- Lipson, S. G. & Lipson, H. (1969). *Optical physics*. Cambridge U.P, London.
- Longley, W. (1975). The packing of double helices. *J. Mol. Biol.* **93**, 111-115.
- Longley, W. (1977). A new crystalline form of tropomyosin. *J. Mol. Biol.* **115**, 381-387.
- Lovell, S. J. & Harrington, W. F. (1981). Measurement of the fraction of myosin heads bound to actin in rabbit skeletal myofibrils in rigor. *J. Mol. Biol.* **149**, 659-674.
- Lowey, S., Goldstein, L., Cohen, C. & Luck, S. M. (1967). Proteolytic degradation of myosin and the meromyosins by a water-insoluble polyanionic derivative of trypsin: properties of a helical subunit isolated from heavy meromyosin. *J. Mol. Biol.* **23**, 287-304.
- Lowey, S., Kucera, J. & Holtzer, A. (1963). On the structure of the paramyosin molecule. *J. Mol. Biol.* **7**, 234-244.

- Lowey, S., Slayter, H. S., Weeds, A. G. & Baker, H. (1969). Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.* **42**, 1-29.
- Luck Vielmetter, D., Schleicher, M., Grabatin, B., Wippler, J. & Gerisch, G. (1990). Replacement of threonine residues by serine and alanine in a phosphorylatable heavy chain fragment of Dictyostelium myosin II. *FEBS Lett.* **269**, 239-243.
- Maeda, K., Rosch, A., Maeda, Y., Kalbitzer, H. R. & Wittinghofer, A. (1991). Rabbit skeletal muscle myosin. Unfolded carboxyl-terminus and its role in molecular assembly. *FEBS Lett.* **281**, 23-26.
- Maeda, K., Sczakiel, G., Hofmann, W., Menetret, J. F. & Wittinghofer, A. (1989). Expression of native rabbit light meromyosin in Escherichia coli. Observation of a powerful internal translation initiation site. *J. Mol. Biol.* **205**, 269-273.
- Maleki, S. J. & Hurlburt, B. K. (1997). High-level expression and purification of MyoD, myogenin, and E12. *Protein Expr. Purif.* **9**, 91-99.
- Maroto, M., Arredondo, J., Goulding, D., Marco, R., Bullard, B. & Cervera, M. (1996). Drosophila paramyosin/miniparamyosin gene products show a large diversity in quantity, localization, and isoform pattern: a possible role in muscle maturation and function. *J. Cell Biol.* **134**, 81-92.
- Maroto, M., Arredondo, J. J., San-Roman, M., Marco, R. & Cervera, M. (1995). Analysis of the paramyosin/miniparamyosin gene. Miniparamyosin is an independently transcribed, distinct paramyosin isoform, widely distributed in invertebrates. *J. Biol. Chem.* **270**, 4375-4382.
- Maruyama, K. (1997). Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *FASEB J.* **11**, 341-345.
- Matsuno, A., Kannda, M. & Okuda, M. (1996). Ultrastructural studies on paramyosin core filaments from native thick filaments in catch muscles. *Tissue Cell* **28**, 501-505.
- Mattler, L. E. & Bang, N. U. (1977). Serine protease specificity for peptide chromogenic substrates. *Thromb. Haemost.* **38**, 776-792.
- Maw, M. C. & Rowe, A. J. (1980). Fraying of A-filaments into three subfilaments. *Nature* **286**, 412-414.
- McDonald, J. K. (1985). An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. *Histochem. J.* **17**, 773-785.
- McLachlan, A. D. & Karn, J. (1982). Periodic charge distributions in the myosin rod amino acid sequence match cross-bridge spacings in muscle. *Nature* **299**, 226-231.
- McLachlan, A. D. & Karn, J. (1983). Periodic features in the amino acid sequence of nematode myosin rod. *J. Mol. Biol.* **164**, 605-626.
- Menetret, J. F., Schroder, R. R. & Hofmann, W. (1990). Cryo-electron microscopic studies of relaxed striated muscle thick filaments. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **11**, 1-11.
- Merrick, J. P. & Johnson, W. H. (1977). Solubility properties of alpha-reduced paramyosin. *Biochemistry* **16**, 2260-2264.
- Miller, A. & Tregear, R. T. (1972). Structure of insect fibrillar flight muscle in the presence and absence of ATP. *J. Mol. Biol.* **70**, 85-104.
- Misra, R. & Reeves, P. (1985). Intermediates in the synthesis of TolC protein include an incomplete peptide stalled at a rare Arg codon. *Eur. J. Biochem.* **152**, 151-155.
- Moll, J. R., Olive, M. & Vinson, C. (2000). Attractive interhelical electrostatic interactions in the proline- and acidic-rich region (PAR) leucine zipper subfamily preclude heterodimerization with other basic leucine zipper subfamilies. *J. Biol. Chem.* **275**, 34826-34832.

- Morris, E. P., Squire, J. M. & Fuller, G. W. (1991). The 4-stranded helical arrangement of myosin heads on insect (*Lethocerus*) flight muscle thick filaments. *J. Struct. Biol.* **107**, 237-249.
- Moussavi, R. S., Kelley, C. A. & Adelstein, R. S. (1993). Phosphorylation of vertebrate nonmuscle and smooth muscle myosin heavy chains and light chains. *Mol. Cell Biochem.* **127-128**, 219-227.
- Murakami, N., Healy Louie, G. & Elzinga, M. (1990). Amino acid sequence around the serine phosphorylated by caseinkinase II in brain myosin heavy chain. *J. Biol. Chem.* **265**, 1041-1047.
- Mykles, D. L. (1988). Histochemical and biochemical characterization of two slow fiber types in decapod crustacean muscles. *J. Exp. Zool.* **245**, 232-243.
- Nakamura, A., Sreter, F. & Gergely, J. (1971). Comparative studies of light meromyosin paracrystals derived from red, white, and cardiac muscle myosins. *J. Cell Biol.* **49**, 883-898.
- Nakaya, M., Kakinuma, M., Watabe, S. & Ooi, T. (1997). Differential scanning calorimetry and CD spectrometry of acclimation temperature-associated types of carp light meromyosin. *Biochemistry* **36**, 9179-9184.
- Nyitrai, L., Mocz, G., Szilagyi, L., Balint, M., Lu, R. C., Wong, A. & Gergely, J. (1983). The proteolytic substructure of light meromyosin. Localization of a region responsible for the low ionic strength insolubility of myosin. *J. Biol. Chem.* **258**, 13213-13220.
- O'Halloran, T. J., Ravid, S. & Spudich, J. A. (1990). Expression of Dictyostelium myosin tail segments in *Escherichiacoli*: domains required for assembly and phosphorylation. *J. Cell Biol.* **110**, 63-70.
- O'Shea, E. K., Klemm, J. D., Kim, P. S. & Alber, T. (1991). X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**, 539-544.
- Offer, G. (1990). Skip residues correlate with bends in the myosin tail. *J. Mol. Biol.* **216**, 213-218.
- Offer, G. & Sessions, R. (1995). Computer modelling of the alpha-helical coiled coil: packing of side-chains in the inner core. *J. Mol. Biol.* **249**, 967-987.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
- Padron, R., Granados, M., Alamo, L., Guerrero, J. R. & Craig, R. (1992). Visualization of myosin helices in sections of rapidly frozen relaxed tarantula muscle. *J. Struct. Biol.* **108**, 269-276.
- Padron, R., Guerrero, J. R., Alamo, L., Granados, M., Gherbesi, N. & Craig, R. (1993). Direct visualization of myosin filament symmetry in tarantula striated muscle by electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **111**, 17-21.
- Pante, N. (1994). Paramyosin polarity in the thick filament of molluscan smooth muscles. *J. Struct. Biol.* **113**, 148-163.
- Parry, D. A. (1975). Analysis of the primary sequence of alpha-tropomyosin from rabbit skeletal muscle. *J. Mol. Biol.* **98**, 519-535.
- Parry, D. A. (1981). Structure of rabbit skeletal myosin. Analysis of the amino acid sequences of two fragments from the rod region. *J. Mol. Biol.* **153**, 459-464.
- Parry, D. A. (1982). Coiled-coils in alpha-helix-containing proteins: analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled-coils in other proteins. *Biosci. Rep.* **2**, 1017-1024.

- Parry, D. A., Crewther, W. G., Fraser, R. D. & MacRae, T. P. (1977). Structure of alpha-keratin: structural implication of the amino acid sequences of the type I and type II chain segments. *J. Mol. Biol.* **113**, 449-454.
- Pasternak, C., Flicker, P. F., Ravid, S. & Spudich, J. A. (1989). Intermolecular versus intramolecular interactions of Dictyosteliummyosin: possible regulation by heavy chain phosphorylation. *J. Cell Biol.* **109**, 203-210.
- Pauling, L. & Corey, R. B. (1953). Compound helical configurations of polypeptide chains: structure of proteins of the alpha-keratin type. *Nature* **171**, 59-61.
- Pepe, F. A. (1967). The myosin filament. I. Structural organization from antibody staining observed in electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **27**, 203-225.
- Pepe, F. A. (1982). The structure of vertebrate skeletal-muscle myosin filaments. *Cell and Muscle Motility* **2**, 141-171.
- Pepe, F. A., Ashton, F. T., Dowben, P. & Stewart, M. (1981). The myosin filament. VII Changes in internal structure along the length of the filament. *J. Mol. Biol.* **145**, 421-440.
- Pepe, F. A., Ashton, F. T., Street, C. & Weisel, J. (1986a). The myosin filament. X. Observation of nine subfilaments in transverse sections. *Tissue Cell* **18**, 499-508.
- Pepe, F. A. & Dowben, P. (1977). The myosin filament. V. Intermediate voltage electron microscopy and optical diffraction studies of the substructure. *J. Mol. Biol.* **113**, 199-218.
- Pepe, F. A., Drucker, B. & Chowrashi, P. K. (1986b). The myosin filament: XI. Filament assembly. *Prep. Biochem.* **16**, 99-132.
- Perona, J. J. & Craik, C. S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* **4**, 337-360.
- Phillips, G. N. J. (1992). What is the pitch of the alpha-helical coiled coil? [published erratum appears in *Proteins* 1993 Oct;17(2):220] [see comments]. *Proteins* **14**, 425-429.
- Phillips, G. N. J., Fillers, J. P. & Cohen, C. (1986). Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J. Mol. Biol.* **192**, 111-131.
- Podlubnaia, Z. A. (1973). [Effect of ionic strength on the structure of light meromyosin paracrystals]. *Biofizika* **18**, 593-599.
- Pohlmann, D (1988). Herstellung und Charakterisierung von Fragmenten aus Insektenmyosin. *Diplomarbeit*, WWU Münster.
- Pringle, J. W. (1978). The Croonian Lecture, 1977. Stretch activation of muscle: function and mechanism. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **201**, 107-130.
- Quinlan, R. A. & Stewart, M. (1987). Crystalline tubes of myosin subfragment-2 showing the coiled-coil and molecular interaction geometry. *J. Cell Biol.* **105**, 403-415.
- Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G. & Holden, H. M. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**, 50-58.
- Redowicz, M. J., Hammer, J. A., III, Bowers, B., Zolkiewski, M., Ginsburg, A., Korn, E. D. & Rau, D. C. (1999). Flexibility of Acanthamoeba myosin rod minifilaments. *Biochemistry* **38**, 7243-7252.
- Redowicz, M. J., Martin, B., Zolkiewski, M., Ginsburg, A. & Korn, E. D. (1994). Effects of phosphorylation and nucleotides on the conformation of myosin II from Acanthamoeba castellanii. *J. Biol. Chem.* **269**, 13558-13563.

- Reedy, M. C. & Beall, C. (1993). Ultrastructure of developing flight muscle in *Drosophila*. I. Assembly of myofibrils. *Dev. Biol.* **160**, 443-465.
- Reedy, M. C., Bullard, B. & Vigoreaux, J. O. (2000). Flightin is essential for thick filament assembly and sarcomere stability in *Drosophila* flight muscles. *J. Cell Biol.* **151**, 1483-1500.
- Reedy, M. C., Reedy, M. K. & Goody, R. S. (1987). The structure of insect flight muscle in the presence of AMPPNP. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **8**, 473-503.
- Reedy, M. K. (1967). Cross-bridges and periods in insect flight muscle. *Am. Zoologist* **7**, 465-481.
- Reedy, M. K. (1968). Ultrastructure of insect flight muscle. I. Screw sense and structural grouping in the rigor cross-bridge lattice. *J. Mol. Biol.* **31**, 155-176.
- Reedy, M. K., Bahr, G. F. & Fischman, D. A. (1973). How many myosins per cross-bridge? I. Flight muscle myofibrils from the blowfly *Sarcophaga bullata*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **37**, 397-422.
- Reedy, M. K., Goody, R. S., Hofmann, W. & Rosenbaum, G. (1983). Co-ordinated electron microscopy and X-ray studies of glycerinated insect flight muscle. I. X-ray diffraction monitoring during preparation for electron microscopy of muscle fibres fixed in rigor, in ATP and in AMPPNP. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **4**, 25-53.
- Reedy, M. K., Leonard, K. R., Freeman, R. & Arad, T. (1981). Thick myofilament mass determination by electron scattering measurements with the scanning transmission electron microscope. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2**, 45-64.
- Reedy, M. K. & Lucaveche, C. (1984). A-band mass exceeds mass of its filament components by 30-45%. *Adv. Exp. Med. Biol.* **170**, 29-45.
- Reedy, M. K., Lucaveche, C., Reedy, M. C. & Somasundaram, B. (1993). Experiments on rigor crossbridge action and filament sliding in insect flight muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* **332**, 33-44.
- Reedy, M. K. & Reedy, M. C. (1985). Rigor crossbridge structure in tilted single filament layers and flared-X formations from insect flight muscle. *J. Mol. Biol.* **185**, 145-176.
- Rowe, T. & Kendrick-Jones, J. (1992). Chimeric myosin regulatory light chains identify the subdomain responsible for regulatory function. *EMBO J.* **11**, 4715-4722.
- Royuela, M., Fraile, B., Cervera, M. & Paniagua, R. (1997). Immunocytochemical electron microscopic study and western blot analysis of myosin, paramyosin and miniparamyosin in the striated muscle of the fruit fly *Drosophila melanogaster* and in obliquely striated and smooth muscles of the earthworm *Eisenia foetida*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **18**, 169-177.
- Rozek, C. E. & Davidson, N. (1983). *Drosophila* has one myosin heavy-chain gene with three developmentally regulated transcripts. *Cell* **32**, 23-34.
- Rudall, K. M. (1956). *Lectures on the Scientific Basis of Medicine* (217-230, British Postgraduate Med. Fed., University of London.
- Ruegg, J. C. & Tregear, R. T. (1966). Mechanical factors affecting the ATPase activity of glycerol-extracted insect fibrillar flight muscle. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **165**, 497-512.
- Ruppel, K. M. & Spudich, J. A. (1995). Myosin motor function: Structural and mutagenic approaches. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 89-93.
- Safer, D. & Pepe, F. A. (1980). Axial packing in light meromyosin paracrystals. *J. Mol. Biol.* **136**, 343-358.
- Sakurai, Y., Kanzawa, N. & Maruyama, K. (1996). Characterization of myosin and paramyosin from crayfish fast and slow muscles. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* **113**, 105-111.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467.
- Schmitz, H. (1990). Zum Aggregationsverhalten von Fragmenten aus Insektenmyosin. *Diplomarbeit*, WWU Münster.
- Schmitz, H., Ashton, F. T., Pepe, F. A. & Beinbrech, G. (1993). Invertebrate myosin filament: parallel subfilament arrangement in the wall of solid filaments from the honeybee, *Apis mellifica*. *Tissue Cell* **25**, 111-119.
- Schmitz, H., Ashton, F. T., Pepe, F. A. & Beinbrech, G. (1994a). Substructures in the core of thick filaments: arrangement and number in relation to the paramyosin content of insect flight muscles. *Tissue Cell* **26**, 83-100.
- Schmitz, H., Lucaveche, C., Reedy, M. K. & Taylor, K. A. (1994b). Oblique section 3-D reconstruction of relaxed insect flight muscle reveals the cross-bridge lattice in helical registration. *Biophys. J.* **67**, 1620-1633.
- Schmitz, H., Reedy, M. C., Reedy, M. K., Tregear, R. T., Winkler, H. & Taylor, K. A. (1996). Electron tomography of insect flight muscle in rigor and AMPPNP at 23 degrees C. *J. Mol. Biol.* **264**, 279-301.
- Seo, J. & Cohen, C. (1993). Pitch diversity in alpha-helical coiled coils [published erratum appears in *Proteins* 1993 Oct;17(2):219] [see comments]. *Proteins* **15**, 223-234.
- Sinard, J. H. & Pollard, T. D. (1989). The effect of heavy chain phosphorylation and solution conditions on the assembly of *Acanthamoeba* myosin-II. *J. Cell Biol.* **109**, 1529-1535.
- Snouwaert, J. N., Jambou, R. C., Skonier, J. E., Earnhardt, K., Stebbins, J. R. & Fowlkes, D. M. (1989). Development of a vector system for the expression of bioengineered proteins. *Clin. Chem.* **35**, B7-12.
- Sohn, R. L., Vikstrom, K. L., Strauss, M., Cohen, C., SzentGyörgyi, A. G. & Leinwand, L. A. (1997). A 29 residue region of the sarcomeric myosin rod is necessary for filament formation. *J. Mol. Biol.* **266**, 317-330.
- Spek, E. J., Bui, A. H., Lu, M. & Kallenbach, N. R. (1998). Surface salt bridges stabilize the GCN4 leucine zipper. *Protein Sci.* **7**, 2431-2437.
- Squire, J., Cantino, M., Chew, M., Denny, R., Harford, J., Hudson, L. & Luther, P. (1998). Myosin rod-packing schemes in vertebrate muscle thick filaments. *J. Struct. Biol.* **122**, 128-138.
- Squire, J. M. (1971). General model for the structure of all myosin-containing filaments. *Nature* **233**, 457-462.
- Squire, J. M. (1972). General model of myosin filament structure. II. Myosin filaments and cross-bridge interactions in vertebrate striated and insect flight muscles. *J. Mol. Biol.* **72**, 125-138.
- Squire, J. M. (1973). General model of myosin filament structure. 3. Molecular packing arrangements in myosin filaments. *J. Mol. Biol.* **77**, 291-323.
- Squire, J. M. (1981). *The Structural basis of muscular contraction*. Plenum Press, New York.
- Squire, J. M. (1992). Muscle filament lattices and stretch-activation: the match- mismatch model reassessed. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **13**, 183-189.

- Standiford, D. M., Davis, M. B., Miedema, K., Franzini-Armstrong, C. & Emerson, C. P. J. (1997). Myosin rod protein: a novel thick filament component of *Drosophila* muscle. *J. Mol. Biol.* **265**, 40-55.
- Steiger, G. J. (1971). Stretch activation and myogenic oscillation of isolated contractile structures of heart muscle. *Pflugers Arch.* **330**, 347-361.
- Stewart, M. (1984). Crystalline sheets of tropomyosin. *J. Mol. Biol.* **174**, 231-238.
- Stewart, M. (1988). Computer image processing of electron micrographs of biological structures with helical symmetry. *J. Electron Microsc. Tech.* **9**, 325-358.
- Stewart, M., Ashton, F. T., Lieberson, R. & Pepe, F. A. (1981). The myosin filament. IX. Determination of subfilament positions by computer processing of electron micrographs. *J. Mol. Biol.* **153**, 381-392.
- Stewart, M. & Kensler, R. W. (1986). Arrangement of myosin heads in relaxed thick filaments from frog skeletal muscle. *J. Mol. Biol.* **192**, 831-851.
- Stewart, M., Kensler, R. W. & Levine, R. J. (1985). Three-dimensional reconstruction of thick filaments from *Limulus* and scorpion muscle. *J. Cell Biol.* **101**, 402-411.
- Straceski, A. J., Geisterfer-Lowrance, A., Seidman, C. E., Seidman, J. G. & Leinwand, L. A. (1994). Functional analysis of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 589-593.
- Strzelecka-Golaszewska, H., Nyitray, L. & Balint, M. (1985). Paracrystalline assemblies of light meromyosins with various chain weights. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **6**, 641-658.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Sutoh, K., Sutoh, K., Karr, T. & Harrington, W. F. (1978). Isolation and physico-chemical properties of a high molecular weight subfragment-2 of myosin. *J. Mol. Biol.* **126**, 1-22.
- Suzuki, K., Doi, T., Imanishi, T., Kodama, T. & Tanaka, T. (1997). The conformation of the alpha-helical coiled coil domain of macrophage scavenger receptor is pH dependent. *Biochemistry* **36**, 15140-15146.
- Swerdlow, H., Dew-Jager, K. & Gesteland, R. F. (1994). Reloading and stability of polyacrylamide slab gels for automated DNA sequencing. *Biotechniques* **16**, 684-693.
- Szent-Györgyi, A. G. (1953). Meromyosins, the subunits of myosin. *Arch. Biochem. Biophys.* **42**, 305-320.
- Taylor, K. A., Reedy, M. C., Cordova, L. & Reedy, M. K. (1984). Three-dimensional reconstruction of rigor insect flight muscle from tilted thin sections. *Nature* **310**, 285-291.
- Taylor, K. A., Reedy, M. C., Cordova, L. & Reedy, M. K. (1989). Three-dimensional image reconstruction of insect flight muscle. I. The rigor myac layer. *J. Cell Biol.* **109**, 1085-1102.
- Taylor, K. A., Reedy, M. C., Reedy, M. K. & Crowther, R. A. (1993). Crossbridge structure in rigor insect flight-muscle imaged by 3-D reconstruction from oblique sections. *Biophys. J.* **64**, A118-
- Taylor, K. A. & Taylor, D. (1992). Formation of 2-D paracrystals of F-actin on phospholipid layers mixed with quaternary ammonium surfactants. *J. Struct. Biol.* **108**, 140-147.

- Taylor, K. A. & Taylor, D. (1999). Structural studies of cytoskeletal protein arrays formed on lipid monolayers. *J. Struct. Biol.* **128**, 75-81.
- Thomas, D. D., Cooke, R. & Barnett, V. A. (1983). Orientation and rotational mobility of spin-labelled myosin heads in insect flight muscle in rigor. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **4**, 367-378.
- Tregear, R. T., Hoyland, J. & Sayers, A. J. (1984). The repeat distance of myosin in the thick filaments of various muscles. *J. Mol. Biol.* **176**, 417-420.
- Tregear, R. T. & Squire, J. M. (1973). Myosin content and filament structure in smooth and striated muscle. *J. Mol. Biol.* **77**, 279-290.
- Trombitas, K., Baatsen, P. H. & Pollack, G. H. (1988a). Effect of tension on the rigor cross-bridge angle. *Adv. Exp. Med. Biol.* **226**, 17-30.
- Trombitas, K., Baatsen, P. H. & Pollack, G. H. (1988b). I-bands of striated muscle contain lateral struts. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **100**, 13-30.
- Trombitas, K. & Tigyi-Sebes, A. (1986). Structure of thick filaments from insect flight muscle. *Acta Biochim. Biophys. Hung.* **21**, 115-128.
- Trybus, K. M. (1994). Regulation of expressed truncated smooth muscle myosins. Role of the essential light chain and tail length. *J. Biol. Chem.* **269**, 20819-20822.
- Uzgiris, E. E. & Kornberg, R. D. (1983). Two-dimensional crystallization technique for imaging macromolecules, with application to antigen-antibody-complement complexes. *Nature* **301**, 125-129.
- Vaillancourt, J. P., Lyons, C. & Cote, G. P. (1988). Identification of two phosphorylated threonines in the tail region of Dictyostelium myosin II. *J. Biol. Chem.* **263**, 10082-10087.
- van den Bos, C., Roth, J., Koch, H. G., Hartmann, M. & Sorg, C. (1996). Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2+)-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton. *J. Immunol.* **156**, 1247-1254.
- Vemuri, R., Lankford, E. B., Poetter, K., Hassanzadeh, S., Takeda, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J. & Epstein, N. D. (1999). The stretch-activation response may be critical to the proper functioning of the mammalian heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 1048-1053.
- Vibert, P. (1992). Helical reconstruction of frozen-hydrated scallop myosin filaments. *J. Mol. Biol.* **223**, 661-671.
- Vieira, J. & Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
- Vikstrom, K. L., Rovner, A. S., Saez, C. G., Bravo-Zehnder, M., Straceski, A. J. & Leinwand, L. A. (1993). Sarcomeric myosin heavy chain expressed in nonmuscle cells forms thick filaments in the presence of substoichiometric amounts of light chains. *Cell Motil. Cytoskeleton* **26**, 192-204.
- Vinos, J., Maroto, M., Garesse, R., Marco, R. & Cervera, M. (1992). Drosophila melanogaster paramyosin: developmental pattern, mapping and properties deduced from its complete coding sequence. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 385-394.
- Ward, R. & Bennett, P. M. (1989). Paracrystals of myosin rod. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **10**, 34-52.
- Warrick, H. M., De Lozanne, A., Leinwand, L. A. & Spudich, J. A. (1986). Conserved protein domains in a myosin heavy chain gene from Dictyostelium discoideum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 9433-9437.

- Weeds, A. G. & Lowey, S. (1971). Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *J. Mol. Biol.* **61**, 701-725.
- Weitkamp, B. (2000). Die Rolle der Makrophagen im Stoffwechsel der extrazellulären Matrix in der arteriellen Gefäßwand. *Dissertation*, WWU, Münster.
- Weitkamp, B., Jurk, K. & Beinbrech, G. (1998). Projectin-thin filament interactions and modulation of the sensitivity of the actomyosin ATPase to calcium by projectin kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 19802-19808.
- Whitby, F. G. & Phillips, G. N. (2000). Crystal structure of tropomyosin at 7 Angstroms resolution. *Proteins-Structure Function and Genetics* **38**, 49-59.
- Wick, M., Tablin, F. & Bandman, E. (1997). Effects of anti-LMM antibodies on the solubility of chicken skeletal muscle myosin. *J. Food Biochem.* **20**, 379-395.
- Winkler, H., Reedy, M. C., Reedy, M. K., Tregear, R. & Taylor, K. A. (1996). Three-dimensional structure of nucleotide-bearing crossbridges in situ: Oblique section reconstruction of insect flight muscle in AMPPNP at 23 degrees C. *J. Mol. Biol.* **264**, 302-322.
- Wray, J. S. (1979a). Filament geometry and the activation of insect flight muscles. *Nature* **280**, 325-326.
- Wray, J. S. (1979b). Structure of the backbone in myosin filaments of muscle. *Nature* **277**, 37-40.
- Wray, J. S. (1982). Organization of myosin in invertebrate thick filaments. *Soc. Gen. Physiol Ser.* **37**, 29-36.
- Wray, J. S., Vibert, P. J. & Cohen, C. (1975). Diversity of cross-bridge configurations in invertebrate muscles. *Nature* **257**, 561-564.
- Yagi, N., Dickens, M. J., Bennett, P. M. & Offer, G. (1981). Electron microscopy and x-ray diffraction of a hexagonal net of light meromyosin. *J. Mol. Biol.* **149**, 787-803.
- Yagi, N. & Offer, G. W. (1981). X-ray diffraction and electron microscopy of a light meromyosin tactoid. *J. Mol. Biol.* **151**, 467-490.
- Yang, J. T., Wu, C. S. & Martinez, H. M. (1986). Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* **130**, 208-269.
- Zahn, K. (1996). Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *J. Bacteriol.* **178**, 2926-2933.
- Zahn, K. & Landy, A. (1996). Modulation of lambda integrase synthesis by rare arginine tRNA. *Mol. Microbiol.* **21**, 69-76.
- Zhou, X., Maeda, Y., Mabuchi, K. & Lehrer, S. S. (1998). Unfolding domains and tryptophan accessibility of a 59 kDa coiled-coil light meromyosin. *Journal of Molecular Biology* **276**, 829-838.
- Ziegler, C., Ader, G. & Beinbrech, G. (1994). Evidence for two myosin types in indirect insect flight muscles. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* **107B**, 91-98.
- Ziegler, C., Ader, G., Rösgen, J. & Beinbrech, G. (1999). ATP and Exon-19 C-termini change the periodicity of paracrystals of Drosophila LMM-fragments from 38 nm to 43 nm. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **20**, 817
- Ziegler, C., Jurk, K., Kölsch, B. & Beinbrech, G. (1996). In vitro interactions of proteins from insect myosin filaments. *Biofizika.* **41**, 78

Zolkiewski, M., Redowicz, M. J., Korn, E. D., Hammer, J. A., III & Ginsburg, A. (1997). Two-state thermal unfolding of a long dimeric coiled-coil: the *Acanthamoeba* myosin II rod. *Biochemistry* **36**, 7876-7883.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Beinbrech für die Stellung des sehr interessanten und facettenreichen Themas, seine über die Jahre wohlwollende Betreuung und die Möglichkeiten, die mir eröffnet wurden. Seine stete Bereitschaft zur fachlichen Diskussion und sein jederzeit offenes Ohr waren mir eine große Stütze. Die gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Landes wird mir immer in guter Erinnerung bleiben.

An besonderer Stelle möchte ich mich beim Arbeitskreis Dr. F.A. Pepe, Dpt. of Cell & Developmental Biology der University of Pennsylvania, für die gastfreundliche Aufnahme in ihrem Labor und die Einführung in die molekularbiologische Methodik bedanken. Den Mitarbeitern im Labor, namentlich PD Shuixing Li und Tom Clarke, danke ich für ihre Unterstützung. Eine außerordentliche Freude und Inspiration hat mir die Zusammenarbeit mit PD Prokash Chowrashi bedeutet.

Dem Arbeitskreis K. A. Taylor und besonders Frau Dr. Dianne W. Taylor, Institute of Molecular Biophysics der FSU, Tallahassee, danke ich herzlich für die Einführung in die Technik der Protein-Kristallisation auf Lipid-Flächen und die Möglichkeit, dort am Institut zu arbeiten. Insbesondere während meiner Aufenthalte in Tallahassee und Philadelphia hat mir Herr Dr. Holger Schmitz freundschaftlich zur Seite gestanden, woran ich gerne zurückdenke.

Ein besonderer Dank geht auch an den Arbeitskreis Rauterberg des Instituts für Arteriosklerose-Forschung der WWU Münster für die Bereitstellung des Elektronenmikroskops und anderer Geräte. Hier möchte ich mich speziell bei Herrn Dr. David Troyer für seinen fachlichen und freundschaftlichen Rat und bei Karin Schlattmann und Marianne Opalka für technische Hilfe bedanken.

Bei den Dres. S.I. Bernstein, UCSD, und C.P. Emerson Jr., University of Pennsylvania, bedanke ich mich herzlich für die Bereitstellung der cDNA des *Drosophila*-MHC-Gens.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Jörg Rösgen, Institut für Physikalische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. Hinz, für seine Unterstützung bei den Arbeiten am Spektropolarimeter danken.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises Janning, Instituts für Allgemeine Zoologie und Genetik der WWU, Münster danke ich für die Überlassung der Versuchstiere.

Bei den Dres. M.K. Reedy und J.S. Wray möchte ich mich für die Möglichkeit zur Erörterung und Aufarbeitung der Ergebnisse bedanken.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, Frau Rotraud Schmidt und Frau Cornelia Rohe nicht nur für technische Unterstützung zu danken.

Für praktische Unterstützung bei Fragen der Phosphorylierung und Mutagenese und seine Bereitschaft, jederzeit sein „know-how“ mit mir zu teilen, möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian van den Bos herzlich bedanken.

Herrn Dr. Benedikt Weitkamp fühle ich mich für sein freundschaftliches Engagement innerhalb und abseits des Labors besonders verbunden.

Meinen Eltern danke ich für ihren unerschütterlichen Glauben und ihren uneingeschränkten Beistand.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Tochter Ann-Christin und ihrer Mutter Claudia, deren Geduld und Verständnis deutlich über das teils altersbedingte Maß hinaus strapaziert worden ist.

Schließlich möchte ich mich bei allen meinen Freunden bedanken, die die unterschiedlichen Phasen des Weges zu dieser Schrift begleitet haben - für ungezählte unbeschwerte Stunden, für behutsame und resolute Ermunterung, für Geduld und Ungeduld. Auch mit ihnen freue ich mich auf die Zeit, in der dieses Thema der Vergangenheit angehört.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname: Ader, Gereon
Geburtsdatum, -ort: 11.07.65, Münster
Familienstand: ledig, ein Kind:
Ann-Christin Puller, geb. 5.11.85
Name des Vaters: Wolfgang Ader
Name der Mutter: Hildegard Ader, geb. Dix

SCHULBILDUNG

08.1971 - 06.1972 Gemeinschaftsgrundschule Regentenstr. in Mönchengladbach
06.1972 - 07.1975 Paul-Gerhardt-Grundschule in Rheine
07.1975 - 10.1978 Gymnasium Dionysianum in Rheine
11.1978 - 06.1984 Gymnasium Petrinum in Recklinghausen
05.06.1984 Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

ZIVILDIENTST

11.1990 - 02.1991 Medizinische Einrichtungen der WWU Münster

STUDIUM

10.1984 - 01.1991 Biologie - Diplom an der WWU Münster
11.1989 - 11.1990 Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Struktur von Insekten-
myosin“
19.01.1991 Diplom im Fach Biologie an der WWU Münster
10.1991 - 06.1992 Weiterbildung im Bereich Molekularbiologie an der University
of Pennsylvania, Philadelphia, USA; DFG-Förderung
07.1992 - 06.1993 Etablierung und Fortführung molekularbiologischer Ansätze
in der Muskelphysiologie
07.1993 - 05.2003 Promotionsarbeit am Institut für Zoophysiologie, Arbeitskreis
Muskelphysiologie der WWU Münster
Betreuer: Prof. Dr. G. Beinbrech: „Fragmente von *Drosophila*-
Myosin: Expression, Aggregationseigenschaften und deren
Bedeutung für Modelle zur Filamentstruktur“
07.1994 – 06.1995 GraFöG-Stipendium

ANSTELLUNGEN

05.1992 - 01.1996,
05.1996, 10.1996 wiss. Hilfskraft am Institut für Zoophysiologie der WWU
02. - 04.; 06.-09.1996 wiss. Angestellter am Institut für Zoophysiologie der WWU
11.-12.1996 wiss. Angestellter am Institut für Arteriosklerose-Forschung,
Prof. Dr. J. Rauterberg, Medizin. Einrichtungen der WWU
07.2001 – 09.2002 Betriebsleitung und Entwicklung, Dr. Fooke GmbH, Neuss
02.2003 – 05.2003 Klinisches Monitoring, Proverum GmbH, Münster

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

08.1999 – 07.2000 Weiterbildung "Projektmanager Biotechnologie"